



**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**INFLUÊNCIAS DOS PROBIÓTICOS NA SAÚDE ORAL**

Trabalho submetido por  
**Perrine Hélène Francine Saïz**  
para a obtenção do grau de Mestre em Medicina Dentária

**Junho 2019**





**INSTITUTO UNIVERSITÁRIO EGAS MONIZ**

**MESTRADO INTEGRADO EM MEDICINA DENTÁRIA**

**INFLUÊNCIAS DOS PROBIÓTICOS NA SAÚDE ORAL**

Trabalho submetido por  
**Perrine Hélène Francine Saïz**  
para a obtenção do grau de **Mestre** em Medicina Dentária

Trabalho orientado por  
**Professor Doutor Nuno Taveira**

**Junho 2019**



## **Dedicatória**

*“You’ve been my favorite Hello,  
Live Love Woof”  
T.*



## Agradecimentos

Ao Professor Doutor Nuno Taveira, por ter aceite orientar este trabalho. Agradeço o seu interesse por este tema, pela disponibilidade e pela sua ajuda. Agradeço também pela sua rapidez de resposta aos meus pedidos, ao seu profissionalismo, aos seus conselhos, a sua dedicação, e pela sua paciência. Agradeço também por ter transmitido rigor de trabalho na realização deste projeto.

Os meus mais profundos agradecimentos aos meus pais, que rapidamente me dirão *“qu’ils ont trouvé la fève dans la galette en croquant dedans, mais qu’ils devront aller chez le dentiste checker leur couronne”*. Ao longo de todo o curso, apoiaram-me, encorajaram-me, ajudaram e protegeram. *“Ils ont su mettre toutes les chances de mon côté pour y arriver”*. Encontrarão neste trabalho todos os seus esforços e a minha maior gratidão.

Aos meus avós pela sua sabedoria e pelo seu conforto. *“Un clin d’oeil tout particulier à mon Pépé pour sa contribution tout au long de mon parcours”*.

À Rita por toda a sua ajuda ao longo desta viagem por terras desconhecidas, que tornou mais fácil a minha integração. Pilar psicológico, as coisas não teriam sido agradáveis sem ela.

Às minhas guarda-costas “Ada & Estelle”, com as quais passei por todas as emoções. E às outras colegas (J&S&R&P&E) das quais guardarei uma boa recordação. *“Smile while you still have teeth”*

Às minhas amigas “Aude & Leslie & Laurie”, presentes apesar da distância e que sempre acreditaram em mim. *“Our blood is dancing in our veins”*

Dedico este trabalho a todas as mulheres admiráveis e originais que me mostraram o caminho e que contribuíram para a minha conquista : a minha Professora de piano, “Mme Salavy” que passou onze anos ao meu lado, que me transmitiu com elegância a mestria desta arte fabulosa ; “Mme Jalabert” a minha Professora particular de « *spécialité mathématiques* » a que tive a honra de ter ao meu lado durante seis anos ; a minha

Professora particular de física ; as minhas Professoras de latim que durante seis anos me transmitiram o seu conhecimento. Agradeço-lhas a sua bondade, energia e motivação, por terem construído o meu espírito e o meu erudismo, assim como terem estimulado a minha curiosidade. Por fim, à minha ama pelos seus doze anos de gentileza e generosidade passados ao seu lado.

E sem esquecer “*l’Aragou*” que indubitavelmente replicaria: “*qu’il y a plus de philosophie dans une bouteille de vin que dans tous les livres; la preuve, qu’importe le flacon, pourvu que tu aies l’ivresse, parce que tout n’est pas cirrrose dans la vie. L’état d’ébriété quel beau pays, mais, ne boie jamais à outrance parce que tu ne sais pas où c’est*”.



## Resumo

**Contextualização:** A cavidade oral é um ecossistema dinâmico, com mudanças ambientais e interações permanentes em que o microbioma comensal limita a colonização dos microrganismos patogénicos. A disbiose do microbioma oral está frequentemente associada a doenças orais de que são exemplos a cárie, a periodontite e a endodontite. Nestes casos pode ser necessário o recurso ao tratamento com antibióticos e/ou antissépticos. Infelizmente, tem-se observado um aumento da resistência bacteriana aos antibióticos e é necessário procurar alternativas a estes agentes. Os probióticos podem oferecer resultados encorajadores na prevenção, tratamento de doenças orais e manutenção da saúde oral. **Objetivo:** Esta revisão sistemática foi elaborada como objetivo de procurar obter comprovação científica, ou não, dos benefícios dos probióticos na saúde oral para definir a utilidade dos probióticos na prática da medicina dentária. **Métodos:** O método de pesquisa bibliográfica em bases de dados eletrónicas (PubMed, ClinicalTrials.gov, ScienceDirect, Google Scholar, B-on, SciELO) para identificação de estudos apoiou-se nos critérios PICOS. Foram incluídos ensaios clínicos randomizados em crianças, adultos e idosos em que a ingestão de probióticos foi comparada com placebo ou outra intervenção. **Resultados:** *B. animalis subsp. lactis* DN-173010 melhorou os parâmetros clínicos periodontais ( $P<0,001$ ) no caso da saúde gengival. *L. reuteri* teve um efeito antimicrobiano ( $P=0,03$ ) no caso da gengivite. *B. animalis subsp. lactis* HN019 e *L. reuteri* permitiram uma redução da PD no caso da periodontite crónica ( $P<0,05$ ). *L. paracasei* SD1 permitiu uma redução da contagem de *S. mutans* ( $P=0,016$ ). *L. salivarius* WB21 diminuiu os níveis de VCS ( $P=0,002$ ), *L. reuteri* reduziu a contagem de *Candida spp.* ( $P<0,05$ ). *L. brevis* CD2 contribuiu para atenuar a mucosite oral e melhorar a qualidade de vida de pacientes submetidos a quimio-radioterapia. **Conclusão:** Não obstante os resultados promissores obtidos nalguns estudos com alguns agentes probióticos orais, a tecnologia probiótica ainda é pouco utilizada a nível oral devido a falta de evidências científicas, heterogeneidade e disparidade nos resultados. **Implicação:** Para que os probióticos representem uma terapia inovadora, atraente e segura para prevenir, manter, controlar e tratar as condições orais diversas é necessário que ensaios clínicos randomizados de longo prazo com tamanho de amostra maior devem ser realizados, de modo a determinar os veículos mais apropriados, as estirpes mais eficazes e as dosagens e frequência de administração adequadas. **Número de registo:** N/A. **Palavras-chaves:** probióticos, prática dentária, saúde oral, doenças orais, microbiota oral



## Abstract

**Background:** The oral cavity is a dynamic ecosystem, with environmental changes and permanent interactions in which the commensal microbiome limits the colonization of pathogenic microorganisms. Dysbiosis of the oral microbiome is often associated with oral diseases such as caries, periodontitis and endodontitis. In these cases antibiotic and / or antiseptic treatment may be necessary. Unfortunately, there has been an increase in bacterial resistance to antibiotics and it is necessary to look for alternatives to these agents. Probiotics can offer encouraging results in the prevention, treatment of oral diseases and maintenance of oral health. **Objective:** This systematic review was designed to obtain scientific evidence of the benefits of probiotics in oral health in order to define the usefulness of probiotics in dental practice. **Methods:** The method of bibliographic search in electronic databases (PubMed, ClinicalTrials.gov, ScienceDirect, Google Scholar, B-on, SciELO) to identify studies was based on the PICOS criteria. Randomized clinical trials were included in children, adults and the elderly in which probiotic ingestion was compared with placebo or other intervention. **Result:** *B. animalis subsp. lactis* DN-173010 improved peridontal clinical criteria ( $P < 0,001$ ) in case of gengival health. *L. reuteri* had na antimicrobial effect ( $P = 0,03$ ) in case of gengivitis. *B. animalis subsp. lactis* HN019 and *L. reuteri* participated in the reduction of PD in cases of chronic periodontitis ( $P < 0,05$ ). *L. paracasei* SD1 participated in the reduction of the *S. mutans* count ( $P = 0,016$ ). *L. salivarius* WB21 reduced VCS levels ( $P = 0,002$ ), *L. reuteri* reduced the count of *Candida spp.* ( $P < 0,05$ ). *L. brevis* CD2 contributed to eased the oral mucositis and improve the quality of life of patients submitted to the chemo-radioterapy. **Limitations:** In the moment that the studies are heterogeneous, comparisons between trials are very limited, which make it difficult to perform meta-analysis. **Conclusion:** Notwithstanding the promising results obtained in some studies with some oral probiotic agents, probiotic technology is still poorly used at the oral level due to lack of scientific evidence, heterogeneity and disparity in results. **Implication:** For probiotics to represent an innovative, attractive and safe therapy to prevent, maintain, control and treat diverse oral conditions it is necessary that long-term randomized clinical trials with larger sample size should be performed in order to determine the vehicles most appropriate strains, the most effective strains and the appropriate dosages and frequency of administration. **Registration number:** N/A. **Key-words:** probiotics, dental practice, oral health, oral diseases, oral microbiota



## Índice Geral

I.	Introdução .....	11
II.	Metodologias .....	15
III.	Resultados.....	19
IV.	Discussão .....	23
a.	Influências dos probióticos em periodontologia.....	23
i.	Saúde gengival e gengivite .....	23
ii.	Periodontite.....	31
iii.	Doenças peri-implantares .....	42
b.	Influência dos probióticos no âmbito da cariologia, na constituição do microbioma e nos componentes imunológicos salivares .....	46
i.	Cariologia e probióticos .....	46
ii.	Probióticos e microbiota oral.....	59
iii.	Probióticos e parâmetros imunológicos salivares.....	65
c.	Outras aplicações dos probióticos em saúde oral .....	67
i.	Papel dos probióticos em ortodontia .....	70
ii.	Papel dos probióticos na halitose.....	71
iii.	Probióticos e Candida spp. ....	73
iv.	Papel dos probióticos na cicatrização de feridas orais e na mucosite oral induzida por quimioterapia ou radioterapia.....	76
d.	Efeitos adversos e segurança dos probióticos .....	79
e.	Características dos diferentes probióticos utilizados nos ensaios clínicos .....	80
f.	Outros parâmetros intervindo nos efeitos dos probióticos .....	80
g.	Limitações dos estudos.....	80
h.	Importância dos estudos in vitro e em animais antes a elaboração de ECR's....	80
V.	Conclusão .....	81
VI.	Bibliografia.....	83

## Índice de Figuras

FIGURA 1 : FUNÇÕES GERAIS ATRIBUÍDAS AOS PROBIÓTICOS QUANDO ATUAM NA CAVIDADE ORAL .....	13
FIGURA 2 : DIAGRAMA DE FLUXO DO PROCESSO DE IDENTIFICAÇÃO DOS ARTIGOS QUE FORAM INCLUÍDOS E EXCLUÍDOS NESTA REVISÃO SISTEMÁTICA .....	20
FIGURA 3 : ORGANIZAÇÃO DOS ECR'S INCLUÍDOS NA REVISÃO SISTEMÁTICA .....	21
FIGURA 4 : PARÂMETROS CLÍNICOS ANTES E APÓS APLICAÇÃO SUBGENGIVAL DE PROBIÓTICOS COMO ADJUVANTE À TERAPIA MECÂNICA TAL COMO PRESENTE EM MALIK ET AL. (2017). DP-DESVIO PADRÃO .....	37
FIGURA 5 : CONTAGEM BACTERIANA ANTES E APÓS APLICAÇÃO SUBGENGIVAL DE PROBIÓTICOS COMO ADJUVANTE À TERAPIA MECÂNICA TAL COMO PRESENTE EM MALIK ET AL. (2017). DP-DESVIO PADRÃO .....	37
FIGURA 6 : OCORRÊNCIA DE CÁRIE EM CRIANÇAS APÓS SUPLEMENTAÇÃO DE L. PARACASEI F19 DURANTE 9 MESES A PARTIR DE 4 MESES DE IDADE-/[HASSLÖF ET AL. (2013)]..	51
FIGURA 7 : CONTAGEM DE S. MUTANS (CFU/mL) SALIVAR ANTES E DEPOIS A INGESTÃO DE BB-12-/BHALLA ET AL. (2015)]/.....	54
FIGURA 8 : AVALIAÇÃO DOS NÍVEIS DE S. MUTANS E LACTOBACILLUS SPP. (EM CFU/mL DE SALIVA) APÓS O CONSUMO DE B. LACTIS-/JAVID ET AL. (2015)]/.....	57
FIGURA 9 : POTENCIAIS FUNÇÕES INDIRETAS DOS PROBIÓTICOS COM IMPACTO SOBRE A CICATRIZAÇÃO DE LESÕES ORAIS .....	76

## Índices de Tabelas

TABELA 1 : PRISMA <i>CHECKLIST</i> .....	15
TABELA 2 : PRISMA <i>CHECKLIST</i> .....	16
TABELA 3 : CRITÉRIOS PICOS E PERGUNTA DE PESQUISA .....	16
TABELA 4 : CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ECR'S RELACIONADOS COM A PERIODONTOLOGIA (SAÚDE GENGIVAL E GENGIVITE) .....	24
TABELA 5 : CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ECR'S RELACIONADOS COM A PERIODONTOLOGIA (SAÚDE GENGIVAL E GENGIVITE) .....	25
TABELA 6 : CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ECR'S RELACIONADOS COM A PERIODONTOLOGIA (PERIODONTITE).....	33
TABELA 7 : CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ECR'S RELACIONADOS COM A PERIODONTOLOGIA (PERIODONTITE).....	34
TABELA 8 : CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ECR'S RELACIONADOS COM A PERIODONTOLOGIA (PERIODONTITE).....	35
TABELA 9 : RESULTADOS IMUNOLÓGICOS DO ESTUDO DE SZKARADKIEWICZ ET AL. (2014) .....	41
TABELA 10 : REDUÇÃO DA PROFUNDIDADE DE SONDAGEM (EM MM) APÓS 12 SEMANAS DE CONSUMO DE PASTILHAS PROBIÓTICAS, EM ADULTOS COM PERIODONTITE CRÔNICA .....	42
TABELA 11 : CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ECR'S RELACIONADOS COM A PERIODONTOLOGIA (CONDIÇÕES PERI-IMPLANTARES) .....	43
TABELA 12 : CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ECR'S RELACIONADOS COM A CARIOLOGIA, A CONSTITUIÇÃO DO BIOFILME/MICROBIOTA, OS PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS SALIVARES (CARIOLOGIA).....	48
TABELA 13 : CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ECR'S RELACIONADOS COM A CARIOLOGIA, A CONSTITUIÇÃO DO BIOFILME/MICROBIOTA, OS PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS SALIVARES (CARIOLOGIA).....	49
TABELA 14 : CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ECR'S RELACIONADOS COM A CARIOLOGIA, A CONSTITUIÇÃO DO BIOFILME/MICROBIOTA, OS PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS SALIVARES (CARIOLOGIA).....	50
TABELA 15 : CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ECR'S RELACIONADOS COM A CARIOLOGIA, A CONSTITUIÇÃO DO BIOFILME/MICROBIOTA, OS PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS SALIVARES (MICROBIOTA ORAL E PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS SALIVARES).....	60

TABELA 16 : CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ECR’S RELACIONADOS COM A CARIOLOGIA, A CONSTITUIÇÃO DO BIOFILME/MICROBIOTA, OS PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS SALIVARES (MICROBIOTA ORAL E PARÂMETROS IMUNOLÓGICOS SALIVARES).....	61
TABELA 17 : CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ECR’S RELACIONADOS COM OUTRAS APLICAÇÕES DE PROBIÓTICOS EM SAÚDE ORAL .....	68
TABELA 18 : CARACTERÍSTICAS GERAIS DOS ECR’S RELACIONADOS COM OUTRAS APLICAÇÕES DE PROBIÓTICOS EM SAÚDE ORAL .....	69
TABELA 19 : PREVALÊNCIA DE CANDIDA SPP. NA SALIVA E NA PLACA, ANTES E APÓS A INGESTÃO DE PASTILHAS PROBIÓTICAS-/[KRAFT-BODI ET AL. (2015)]/.....	74
TABELA 20 : COMPARAÇÃO ENTRE O GRUPO PROBIÓTICO E O GRUPO PLACEBO DE VÁRIOS PARÂMETROS CLÍNICOS APÓS O CONSUMO DE PASTILHAS DE L. BREVIS CD2, NO MANEJO DA MUCOSITE ORAL EM PACIENTES SUBMETIDOS A QUIMIO-RADIOTERAPIA DA CABEÇA E DO PESCOÇO-/[SHARMA ET AL. (2012)]/.....	78



## **Lista de Abreviaturas**

ECR's: ensaios clínicos randomizados

EC: ensaio clínico

GCF: fluido crevicular gengival

PI: índice de placa

GI: índice gengival

CHX: chlorohexidina

BOP: hemorragia a sondagem

NO: óxido nítrico

TPS: terapia periodontal de suporte

PD: profundidade de sondagem

SRP: alisamento radicular

CAL: nível de inserção clínico

LPS: lipopolisacárido

MMPs: metaloproteases

IFNs: interferons

ATB: antibióticos

ATF: antifúngicos

*MS: Streptococcus mutans*

*LB: Lactobacillus spp.*



## I. Introdução

A cavidade oral é um ecossistema dinâmico, com mudanças ambientais e interações permanentes em que as bactérias comensais são majoritárias e limitam a colonização dos microrganismos patogênicos. Isto ocorre de forma complexa através dos metabolitos e antígenos bacterianos, e com a intervenção da imunidade celular (Schlagenhauf *et al.*, 2016). A microflora oral é heterogênea e diversificada, e o seu desequilíbrio leva ao aparecimento de doenças orais (tais como as doenças periodontais, a cárie dentária, a halitose, e candidíase) (Deshmukh *et al.*, 2017). As terapêuticas que visam eliminar a placa bacteriana responsável por patologias, têm dificuldade em lidar com os múltiplos microrganismos existentes na placa e com a resistência dos microrganismos aos antibióticos e desinfetantes. É necessário procurar alternativas e adjuvantes aos agentes terapêuticos convencionais e, neste contexto, os probióticos podem ter um papel importante na manutenção da saúde oral (Nadkerny, Ravishankar, Pramod, Agarwal, & Bhandari, 2015a)(Shah, Gujjari, & Chandrasekhar, 2013).

Os probióticos representam uma terapia inovadora, chamada também de bacterioterapia, que consiste em trocar as bactérias/estirpes patogênicas orais pelas bactérias/estirpes inofensivas comensais e aumentar a porção de bactérias benéficas (Sabatini *et al.*, 2017) (Tekce *et al.*, 2015) (M. K. Keller, Brandsborg, Holmstrøm, & Twetman, 2018). Essa inovação foi sugerida por vários pesquisadores e é uma abordagem considerada mais natural para enfrentar a microbiota disbiótica (Vicario, Santos, Violant, Nart, & Giner, 2013). As estratégias probióticas são muito utilizadas para a microbiota intestinal. No entanto, esta tecnologia probiótica ainda é pouco utilizada a nível oral devido a falta de evidências científicas, controvérsias nos resultados clínicos, microbiológicos e imunológicos e falta de conhecimentos dos seus mecanismos de ação na flora oral *in vivo* (Deshmukh *et al.*, 2017) (Tekce *et al.*, 2015) (Vicario *et al.*, 2013).

Devido à complexidade da ecologia oral, os probióticos devem responder a vários desafios tais como suportar as condições ambientais orais, colonizar e aderir às superfícies orais, inibir os agentes patogênicos (Nadkerny *et al.*, 2015a), e retardar a colonização pelas estirpes patogênicas (Tekce *et al.*, 2015a). Além disso, não devem fermentar os açúcares de modo a evitar a diminuição do pH e consequentemente a

desmineralização do esmalte, devem dificultar a organização da matriz extracelular responsável pela formação do biofilme, limitar os produtos citotóxicos e devem também alterar benéficamente os parâmetros bioquímicos que influenciam a placa dentária (componentes salivares, capacidade tampão) (Yousuf *et al.*, 2017a). Ademais e não menos importante, a implementação dos probióticos deve ser segura para o hospedeiro (Vicario *et al.*, 2013) (Dhawan & Dhawan, 2013).

Segundo a *Organização Mundial da Saúde* (OMS) e a *Organização das Nações Unidas para Agricultura e Alimentação* (ONUAA), os probióticos são “microrganismos vivos que, quando administrados em quantidades adequadas, conferem benefícios à saúde do hospedeiro”. Devem ser caracterizados quanto à nomenclatura, gênero e espécie, e estudados *in vitro* e *in vivo* (mecanismo de ação, atividades metabólicas, segurança) antes de serem submetidos a ensaios clínicos randomizados (FAO/OMS, 2006). Os probióticos mais utilizados são os *Lactobacillus spp.*, os *Bifidobacterium spp.*, mas também são usados os *Propionibacterium spp.* e os *Streptococcus spp.* (Jose, Padmanabhan, & Chitharanjan, 2013a) (Nadkerny *et al.*, 2015a) (Kuru, Laleman, Yalnızoğlu, Kuru, & Teughels, 2017). As fontes mais utilizadas nos alimentos são os iogurtes e produtos lácteos fermentados; a suplementação dietética de probióticos passa também pela ingestão de cápsulas, comprimidos e pastilhas (Shah *et al.*, 2013) (Jose *et al.*, 2013a). A combinação de probióticos tende a ser sinérgica nos seus efeitos, e facilita uma colonização permanente (Dhawan & Dhawan, 2013) (Penala *et al.*, 2016) (Hedayati-Hajikand, Lundberg, Eldh, & Twetman, 2015a). Um contato com os probióticos na infância leva ao aparecimento de uma colonização permanente mais plausível do que um contato mais tardio na idade adulta (Hedayati-Hajikand *et al.*, 2015a). Assim, os probióticos podem ser vistos como “novas estratégias preventivas autoadministradas” que podem contribuir para reduzir as desigualdades no âmbito da saúde oral (Hedayati-Hajikand *et al.*, 2015a).

Os probióticos trazem benefícios comprovados para a saúde geral quando utilizados no tratamento de distúrbios gastrointestinais (exs. diarreia, síndrome do colon irritável, doenças inflamatórias intestinais), alergias, intolerância a lactose, infecções orofaríngeas, infecções urogenitais e doenças metabólicas (Jose *et al.*, 2013a) (Vicario *et al.*, 2013) (Nozari, Motamedifar, Seifi, Hatamizargaran, & Ranjbar, 2015) (Toiviainen *et al.*, 2015) (Alanzi *et al.*, 2018), logo, pode pressupor-se que eles serão também uma

ferramenta útil para a saúde oral. Contudo algumas estirpes probióticas (exs. *Lactobacillus spp.*, *Bifidobacterium spp.*, *Streptococcus spp.*) já foram associadas a endocardite, bacteriemia, septicemia e infecções nosocomiais, em pessoas imunocomprometidas e recém-nascidos prematuros (Yousuf *et al.*, 2017a). As pesquisas atuais avaliam a aplicação dos probióticos no campo da periodontologia, da cárie dentária, da halitose e da candidíase oral, e no estabelecimento do biofilme oral (Shah *et al.*, 2013). No entanto é preciso realizar pesquisas mais aprofundadas para esclarecer os seus mecanismos de ação, as estirpes mais em conformidade com a saúde do hospedeiro, bem como a dosagem e o veículo mais adequado para maximizar a adesão do paciente, e a eficácia do produto probiótico (Jose *et al.*, 2013a).

Os efeitos dos probióticos na microflora oral não são ainda claros (Dhawan & Dhawan, 2013). São-lhes atribuídas várias funções (Figura 1).



Figura 1 : Funções gerais atribuídas aos probióticos quando atuam na cavidade oral

No entanto, os mecanismos de ação dos probióticos parecem ser diferentes de uma espécie/estirpe para outra (Nadkerny *et al.*, 2015a), diferentes entre as populações estudadas e dependentes do veículo utilizado (Jäsberg, Tervahartiala, Sorsa, Söderling, & Haukioja, 2018).

O objetivo desta revisão foi procurar obter comprovação científica, ou não, dos benefícios dos probióticos na saúde oral e qualidade de vida.

## II. Metodologias

O protocolo de estudo não está registrado no “PROSPERO data-base”. Foram seguidas as recomendações da declaração PRISMA para revisões sistemáticas (Tabelas 1 e 2) (disponíveis em: Moher D, Liberati A, Tetzlaff J, Altman DG, The PRISMA Group (2009). Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyses: The PRISMA Statement. PLoS Med 6(7): e1000097. doi:10.1371/journal.pmed1000097).

Tabela 1 : PRISMA *checklist*

Section/topic	#	Checklist item	Reported on page #
<b>TITLE</b>			
Title	1	Identify the report as a systematic review, meta-analysis, or both.	N/A
<b>ABSTRACT</b>			
Structured summary	2	Provide a structured summary including, as applicable: background; objectives; data sources; study eligibility criteria, participants, and interventions; study appraisal and synthesis methods; results; limitations; conclusions and implications of key findings; systematic review registration number.	1
<b>INTRODUCTION</b>			
Rationale	3	Describe the rationale for the review in the context of what is already known.	11-14
Objectives	4	Provide an explicit statement of questions being addressed with reference to participants, interventions, comparisons, outcomes, and study design (PICOS).	14
<b>METHODS</b>			
Protocol and registration	5	Indicate if a review protocol exists, if and where it can be accessed (e.g., Web address), and, if available, provide registration information including registration number.	N/A
Eligibility criteria	6	Specify study characteristics (e.g., PICOS, length of follow-up) and report characteristics (e.g., years considered, language, publication status) used as criteria for eligibility, giving rationale.	17-18
Information sources	7	Describe all information sources (e.g., databases with dates of coverage, contact with study authors to identify additional studies) in the search and date last searched.	17
Search	8	Present full electronic search strategy for at least one database, including any limits used, such that it could be repeated.	17
Study selection	9	State the process for selecting studies (i.e., screening, eligibility, included in systematic review, and, if applicable, included in the meta-analysis).	17-18
Data collection process	10	Describe method of data extraction from reports (e.g., piloted forms, independently, in duplicate) and any processes for obtaining and confirming data from investigators.	17-18
Data items	11	List and define all variables for which data were sought (e.g., PICOS, funding sources) and any assumptions and simplifications made.	16-18
Risk of bias in individual studies	12	Describe methods used for assessing risk of bias of individual studies (including specification of whether this was done at the study or outcome level), and how this information is to be used in any data synthesis.	N/A
Summary measures	13	State the principal summary measures (e.g., risk ratio, difference in means).	N/A
Synthesis of results	14	Describe the methods of handling data and combining results of studies, if done, including measures of consistency (e.g., $I^2$ for each meta-analysis).	N/A

Tabela 2 : PRISMA checklist

Section/topic	#	Checklist item	Reported on page #
Risk of bias across studies	15	Specify any assessment of risk of bias that may affect the cumulative evidence (e.g., publication bias, selective reporting within studies).	N/A
Additional analyses	16	Describe methods of additional analyses (e.g., sensitivity or subgroup analyses, meta-regression), if done, indicating which were pre-specified.	N/A
<b>RESULTS</b>			
Study selection	17	Give numbers of studies screened, assessed for eligibility, and included in the review, with reasons for exclusions at each stage, ideally with a flow diagram.	19-20
Study characteristics	18	For each study, present characteristics for which data were extracted (e.g., study size, PICOS, follow-up period) and provide the citations.	24,25,33-35, 43,48-50,60, 61,68,69
Risk of bias within studies	19	Present data on risk of bias of each study and, if available, any outcome level assessment (see item 12).	N/A
Results of individual studies	20	For all outcomes considered (benefits or harms), present, for each study: (a) simple summary data for each intervention group (b) effect estimates and confidence intervals, ideally with a forest plot.	N/A
Synthesis of results	21	Present results of each meta-analysis done, including confidence intervals and measures of consistency.	N/A
Risk of bias across studies	22	Present results of any assessment of risk of bias across studies (see Item 15).	N/A
Additional analysis	23	Give results of additional analyses, if done (e.g., sensitivity or subgroup analyses, meta-regression [see Item 16]).	N/A
<b>DISCUSSION</b>			
Summary of evidence	24	Summarize the main findings including the strength of evidence for each main outcome; consider their relevance to key groups (e.g., healthcare providers, users, and policy makers).	23-80
Limitations	25	Discuss limitations at study and outcome level (e.g., risk of bias), and at review-level (e.g., incomplete retrieval of identified research, reporting bias).	N/A
Conclusions	26	Provide a general interpretation of the results in the context of other evidence, and implications for future research.	81-82
<b>FUNDING</b>			
Funding	27	Describe sources of funding for the systematic review and other support (e.g., supply of data); role of funders for the systematic review.	N/A

Os critérios PICOS que permitiram a elaboração das perguntas de pesquisa são apresentados na Tabela 3.

Tabela 3 : Critérios PICOS e pergunta de pesquisa  
(disponíveis em: <https://libguides.murdoch.edu.au/systematic/PICO>)

P	I	C	O	S
Population or Problem	Intervention or Exposure	Comparison	Outcome	Study design
Adultos, crianças, idosos, saudáveis ou não	Uso de probióticos	Placebo ou comparado com/sem outra intervenção	Benefícios para a saúde oral	Ensaio clínico randomizado cego ou duplo/triplo cego
Há evidências científicas de que o uso de probióticos confere benefícios à saúde oral do hospedeiro ?				



Os critérios de elegibilidade dos estudos a incluir na revisão foram:

- 1) Tipos de estudo: ensaios clínicos randomizados, sem identificação de ocultação, cegos (simples, duplo ou triplo), controlado ou não por placebo (comparado com outra intervenção), incluindo estudos cruzados.
- 2) Tipos de participantes: de qualquer idade (adultos, crianças, idosos), sem restrição de género, saudáveis ou não.
- 3) Tipo de intervenção: uso de qualquer probiótico (isolado ou em combinação, a quando as espécies probióticas usadas foram definidas).
- 4) Considerando qualquer regime de dosagem, veículo de entrega ou frequência de intervenção. Os comparadores podem consistir em placebo ou outra intervenção ativa sem probióticos (com ou sem pré-biótico/simbiótico vs. placebo/outra intervenção). Foram analisados estudos que incluíssem um auxiliar ao tratamento ativo.
- 5) Resultados primários: parâmetros clínicos, microbiológicos, imunológicos.
- 6) Resultados secundários: qualquer efeito adverso, taxa de adesão, qualidade de vida.

A pesquisa bibliográfica foi realizada em bases de dados eletrónicas (PubMed, ClinicalTrials.gov, ScienceDirect, Google Scholar, B-on, SciELO); utilizando as palavras chaves “probiotics”, “dental practice”, “oral health”, “oral diseases” e “oral microbiota”. Foram selecionados artigos publicados entre janeiro 2012 e maio 2019 com “texto completo disponível”, escritos em inglês. As referências duplicadas, artigos disponíveis em 2011 publicados em 2012, as teses, as revisões, e os artigos relacionados com a ingestão de probióticos orais com unicamente repercussão sistémica foram excluídos. Pesquisas adicionais foram efetuadas após leitura das referências de todos os artigos relevantes.

Os artigos foram selecionados em primeiro lugar pelos títulos e informação presente nos resumos tendo em consideração os critérios de inclusão. Os artigos duplicados foram removidos. Os textos completos de todos os artigos que obedeciam aos critérios de inclusão foram obtidos e examinados para inclusão definitiva. O processo de seleção foi incluído num diagrama PRISMA (Figura 2).

Para cada estudo incluído foram coletadas as informações seguintes: 1) Objetivo(s) do estudo, parâmetros avaliados; 2) Tamanho de amostra no início e no fim da intervenção; 3) Características dos participantes (faixa-etária, idade, gênero, condição oral, estilo de vida: dieta, higiene oral, critérios de inclusão e de exclusão); 4) intervenção e controle: número de grupo, intervenções aplicadas, duração e frequência de administração, estirpes probióticas usadas, veículo de entrega, dosagem, monitorização; 5) Métodos: desenho de estudo, duração do estudo, alocação, ocultação; 6) Resultados: resultados no início do estudo, durante os tempos de monitorização, no fim do estudo; 7) Outros: comentários dos autores, principais conclusões dos autores e outros comentários.

### III. Resultados

A pesquisa eletrônica conduzida até maio 2019, identificou 294 referências. Depois de remover as duplicadas, foram selecionadas 229 referências com base nos títulos e resumos para elegibilidade, descartando os estudos *in vitro* e em animais, os ensaios clínicos ainda em curso e não publicados. Foram identificados mais 12 artigos após pesquisa nas referências. Foram selecionados 121 artigos para a revisão de texto completo. Destes foram excluídos 36 ensaios clínicos e incluídos 85 de acordo com os critérios de elegibilidade (Figura 2).

Os 85 ECR's incluíram os dados de 5013 participantes. A dimensão das amostras varia entre 10 e 321 participantes. A duração das intervenções variou entre 7 dias e até 2 anos. Foram contabilizados 51 estudos realizados em adultos, 20 em crianças, 3 em idosos, e 11 abrangem mais de uma faixa-etária.

Em relação ao probiótico(s) administrado(s), 46 estudos implementaram uma combinação de probióticos e 38 administraram um único probiótico. Dois estudos utilizaram simbiótico/pré-biótico (1 com um único probiótico e 1 numa combinação). Em 28 estudos não foram comunicadas as concentrações utilizadas de probióticos. Um único estudo não indicou os probióticos utilizados. Num estudo a duração da administração de probiótico(s) não foi dada.

Efeitos adversos foram relatados em 9 ensaios.

Em relação ao desenho de estudo: há 13 ensaios cruzados, 77 ensaios controlados por placebo e 8 comparados com outra intervenção.

Em relação à ocultação: são 15 os estudos sem indicação de ocultação, 4 são cego, 60 duplo-cego e 5 são triplo-cego. Os resultados primários dos estudos concentram-se principalmente nos parâmetros clínicos, microbiológicos e imunológicos.

Não foram analisados dados em relação ao financiamento, *for-profit* viés e localização dos estudos.

Os 36 estudos excluídos após leitura dos textos completos foram eliminados porque não investigaram os probióticos para a saúde oral, porque a intervenção não ficou clara ou não foi com probiótico, porque o desenho de estudo estava confuso, não havia informação sobre a randomização, porque estudavam a ingestão de probióticos em animais e porque foram executados *in vitro*.

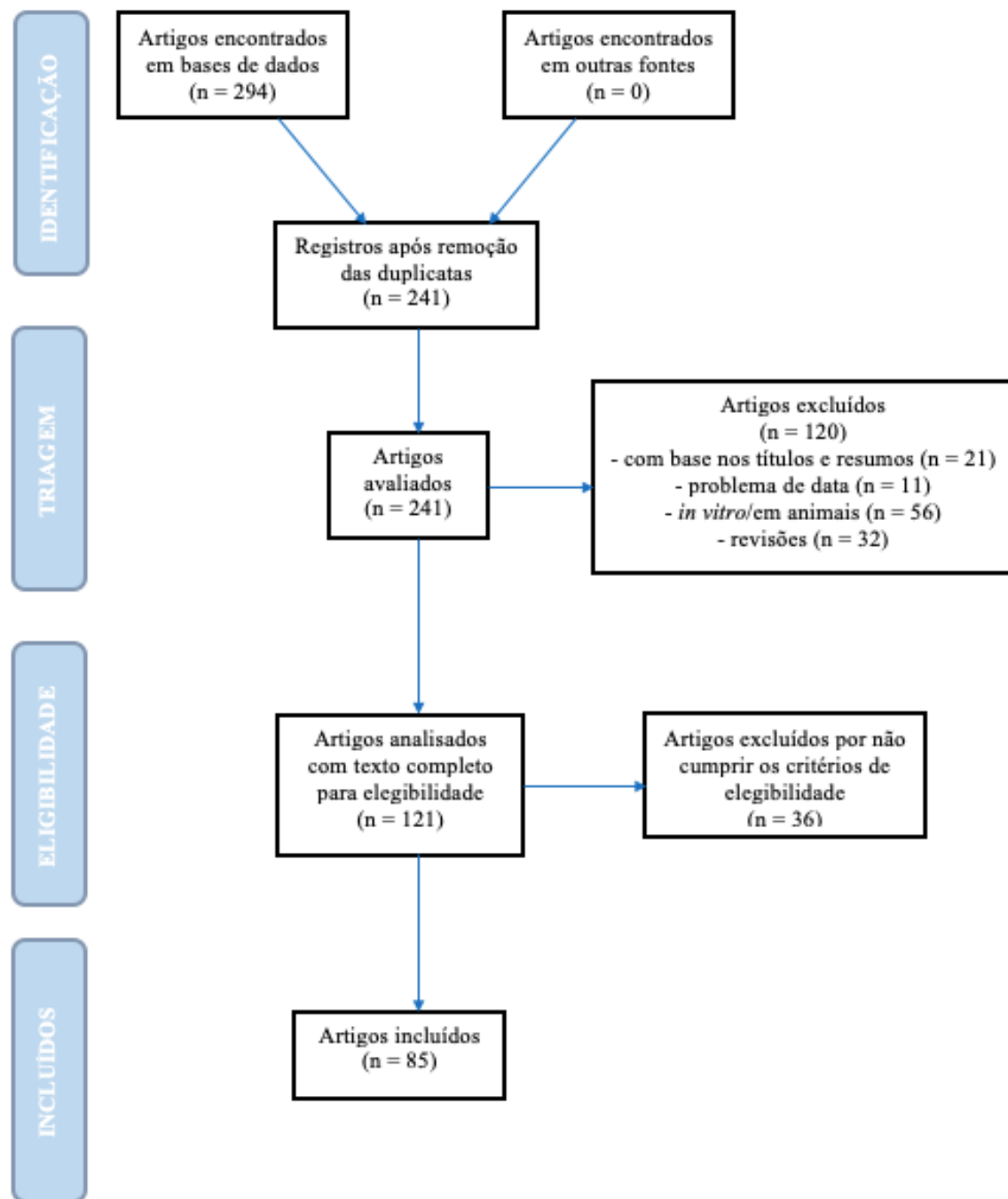


Figura 2 : Diagrama de fluxo do processo de identificação dos artigos que foram incluídos e excluídos nesta revisão sistemática

Os 85 ensaios clínicos randomizados incluídos na revisão foram organizados da seguinte maneira (Figura 3):

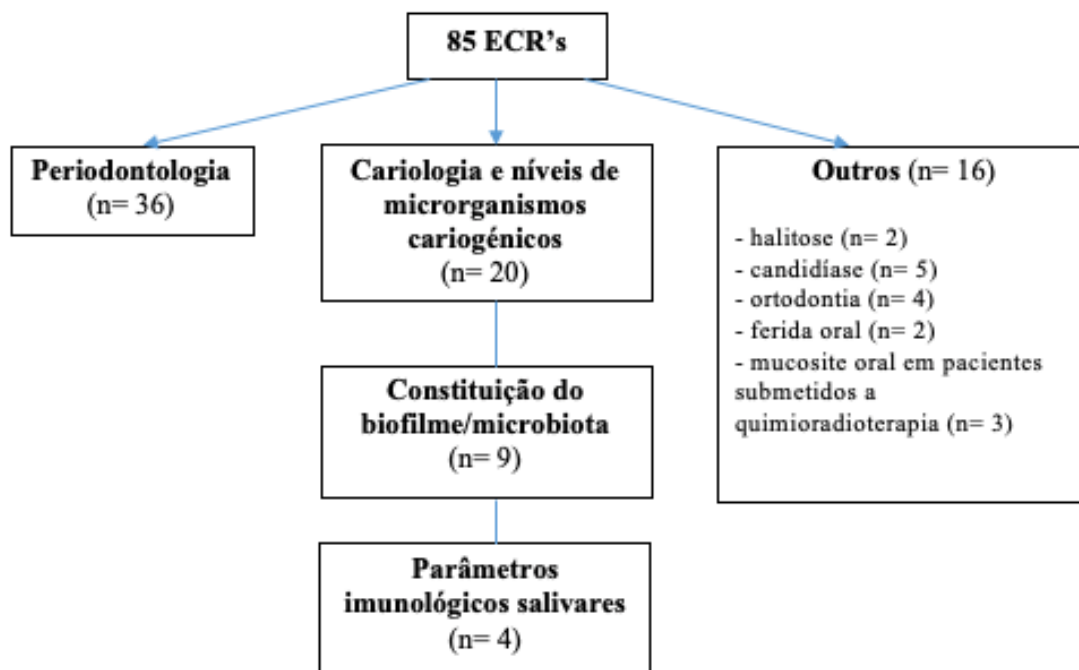


Figura 3 : Organização dos ECR's incluídos na revisão sistemática

Os ensaios clínicos randomizados (ECR's) foram agrupados em diferentes tabelas em função das doenças orais envolvidas (Tabelas 4-8, 11-18).



#### IV. Discussão

##### a. Influências dos probióticos em periodontologia

A periodontite é provocada por bactérias periodontopatogénicas (*Porphyromonas gingivalis*, *Treponema denticola*, *Tannerella forsythia* e *Aggregatibacter actinomycetocomitans*) que se organizam em biofilmes (a nível supragengival e subgengival) em hospedeiros suscetíveis. Os tratamentos da periodontite consistem na remoção mecânica do biofilme patogénico e na utilização de antissépticos ou antibióticos (Nadkerny *et al.*, 2015a). O objetivo principal dos tratamentos é evitar uma nova colonização por bactérias patogénicas (Chandra *et al.*, 2016) (Peña *et al.*, 2018). Os probióticos como adjuvantes ao tratamento mecânico poderiam modificar e ocupar o nicho subgengival suscetível à recolonização por bactérias patogénicas e permitir uma nova harmonia com o ambiente oral (Nadkerny *et al.*, 2015a) (Chandra *et al.*, 2016). Segundo (Hallström *et al.*, 2013) os probióticos poderiam ainda alterar localmente o perfil bacteriano do biofilme adjacente aos implantes. Além disso, poderiam atuar através da imunomodulação causando o aumento de IL-10 que inibe IL-1 $\beta$  e TNF- $\alpha$ , o aumento de TGF- $\beta$ 1 que participa na reparação tecidular pelo aumento das TIMP para sintetizar moléculas presentes na matriz extracelular e/ou a redução de IL-8, uma citocina pró-inflamatória que desempenha um papel na reabsorção óssea através da diferenciação dos osteoclastos (Chandra *et al.*, 2016; Hallström *et al.*, 2013; İnce *et al.*, 2015a; Jäsberg *et al.*, 2018). De facto, alguns dos ECR's que analisámos mostraram que a utilização dos probióticos como adjuvante no tratamento não cirúrgico da gengivite e periodontite conferem benefícios adicionais nos parâmetros clínicos, microbiológicos e imunológicos. Contudo, os resultados são discutíveis porque nem todos os ensaios clínicos revelaram conclusões semelhantes (Galofré, Palao, Vicario, Nart, & Violant, 2018).

##### i. Saúde gengival e gengivite

Foram analisados 14 ensaios clínicos randomizados relacionados com a implementação de probióticos em condições de gengivite e saúde gengival que avaliaram a acumulação de placa, o estado de inflamação gengival, a manutenção da higiene oral e ao mesmo tempo tentaram examinar os diferentes mecanismos de ação dos probióticos.

Tabela 4 : Características gerais dos ECR's relacionados com a periodontologia (saúde gengival e gengivite)

Descrição dos ECR's relacionados com a periodontologia (saúde gengival e gengivite)					
Referência Condição oral	Parâmetros avaliados Tempo de avaliação	Desenho estudo Grupos de estudo	Tamanho amostra (no fim do estudo) Idade ou faixa-etária	Protocolo da implementação de probiótico(s): Veículo Tempo de administração	Estirpe(s) probiótica(s) utilizada(s)
<b>Alanzi et al., 2018</b>  <b>Saúde gengival</b>	Parâmetros clínicos (PI, GI), microbiológicos (a partir de amostras de saliva e placa) - baseline e 4 semanas	ECR controlado por placebo, duplo-cego - Grupo probiótico e grupo placebo	101 pacientes saudáveis - 13-15 anos	Pastilha - 4 semanas (2 vezes por dia)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> (4,8.10 <sup>8</sup> cada)
<b>Deshmukh et al., 2017</b>  <b>Saúde gengival</b>	Parâmetros clínicos (OHI-S, PI, GI) - baseline, 7, 14 dias	ECR controlado por placebo, triplo-cego - Grupo A: HiOra 15mL Grupo B: CHX 0,2% Grupo C: probiótico (dissolvido em 20mL água)	45 pacientes saudáveis - 18-21 anos	Bochecho - 14 dias (2 vezes ao dia durante 60 segundos)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> , <i>Saccharomyces boulardii</i> (1,25 bilhões células)
<b>Kuru et al., 2017</b>  <b>Saúde gengival</b>	Parâmetros clínicos (PI, GI, PD, BOP), imunológicos (volume GCF, IL-1 $\beta$ ) - baseline, 28, 33 dias (5 dias sem escovar)	ECR controlado por placebo, simples cego - Grupo probiótico: iogurte 110g + probiótico Grupo placebo: iogurte 110g	51 pacientes saudáveis - 16-26 anos	Iogurte 110mg - 28 dias (1 vez por dia)	<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> DN-173010 (>10 <sup>8</sup> CFU)
<b>Yousuf et al., 2017</b>  <b>Saúde gengival</b>	Parâmetros clínicos (GI, PI) - baseline, 7, 14, 21 dias	ECR controlado, duplo-cego - Grupo A: probióticos Grupo B: bacilo de ácido láctico liofilizado Grupo C: placebo de carbonato de cálcio em pó 250 g	22 pacientes saudáveis - 12-15 anos	Preparação liofilizada - 3 semanas (1 vez por dia)	<i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> , <i>Bifidobacterium bifidum</i> , <i>Bifidobacterium lactis</i> e <i>Bacillus</i> do ácido láctico
<b>Hallström et al., 2013</b>  <b>Gengivite experimental</b>	Parâmetros clínicos (GI, PI, BOP), microbiológicos, imunológicos (volume GCF, citocinas) - baseline, 3 semanas	ECR cruzado, controlado, duplo-cego <i>Run in</i> 2 semanas – intervenção 3 semanas- <i>washout</i> 2 semanas – intervenção 3 semanas - Grupo probiótico e grupo placebo	18 mulheres saudáveis - média 38 anos	Losangos - 3 semanas (2 vezes ao dia)	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM17938 e ATCC PTA 5289
<b>Keller et al., 2018</b>  <b>Gengivite</b>	Parâmetros clínicos (BOP, PI, volume GCF), imunológicos (citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10, TNF- $\alpha$ no GCF) - baseline, 2, 4, 6 semanas	ECR controlado por placebo, duplo-cego - Grupo probiótico e grupo placebo	47 pacientes com pelo menos 2 locais com inflamação gengival moderada de acordo com o índice de Löe, com PD $\leq$ 5 mm - média 26,9 anos	Comprimido - 4 semanas (2 vezes por dia)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> PB01, DSM 14869, <i>Lactobacillus curvatus</i> EB10, DSM 32307



Tabela 5 : Características gerais dos ECR's relacionados com a periodontologia (saúde gengival e gengivite)

Descrição dos ECR's relacionados com a periodontologia (saúde gengival e gengivite)					
Referência Condição oral	Parâmetros avaliados Tempo de avaliação	Desenho estudo Grupos de estudo	Tamanho amostra (no fim do estudo) Idade ou faixa-etária	Protocolo da implementação de probiótico(s): Veículo Tempo de administração	Estirpe(s) probiótica(s) utilizada(s)
Sabatini <i>et al.</i> , 2017  Gengivite em diabéticos tipo II	Parâmetros clínicos (PI, BOP) - baseline e 30 dias	ECR controlado, duplo-cego - Grupo probiótico e grupo controle	80 pacientes com diabetes tipo II controlado e gengivite generalizada - média 47 anos	Comprimido - 30 dias (2 vezes ao dia)	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938 e ATCC PTA 5289
Alkaya <i>et al.</i> , 2017  Gengivite	Parâmetros clínicos (PI, GI, PD, BOP, sarro lingual) - 3 e 8 semanas	ECR controlado por placebo, duplo-cego - Grupo probiótico e grupo placebo	40 pacientes saudáveis, gengivite generalizada - 18-31 anos	Pasta dentífrica, bochecho, limpador escova (3 modos de aplicação) - 8 semanas (2 vezes por dia)	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus pumilus</i> (5,9.10 <sup>7</sup> esporos)
Montero <i>et al.</i> , 2017  Gengivite	Parâmetros clínicos (GI, PI), microbiológicos - baseline e 6 semanas	ECR controlado por placebo, duplo-cego - Grupo probiótico e grupo controle	52 pacientes com gengivite - 18-55 anos	Comprimido - 6 semanas (2 vezes por dia)	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>brevis</i> , <i>Peiococcus acidilactici</i> (1x10 <sup>3</sup> CFU cada)
Schlagenhauf <i>et al.</i> , 2016  Gengivite em grávidas	Parâmetros clínicos (GI, PI), microbiológicos ( <i>P. intermedia</i> ), imunológicos (TNF- $\alpha$ ) - baseline e 2 dias após o parto	ECR controlado por placebo, duplo-cego - Grupo probiótico e grupo placebo	45 mulheres saudáveis com gengivite gravídica (3º trimestre de gravidez) - 24-40 anos	Pastilha - 2 vezes ao dia até o nascimento (cerca de 7 semanas)	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM17938 e ATCC PTA 5289 (> 10 <sup>8</sup> CFU cada)
Nadkerny <i>et al.</i> , 2015  Gengivite	Parâmetros clínicos (PI, GI, OHI-S) - baseline, 2 e 4 semanas	ECR, controlado - Grupo A: probióticos Grupo B: CHX 0,02% (controle positivo) Grupo C: solução salina (controle negativo)	45 pacientes saudáveis com gengivite crônica - 20-30 anos	Bochecho - 15 dias (2 vezes ao dia durante 60 segundos)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>acidophilus</i> , <i>Saccharomyces</i> , <i>Lactobacillus sporogenes</i> (1,25 bilhões células)
Lee <i>et al.</i> , 2015  Gengivite experimental	Parâmetros clínicos (PI, GI, BOP) Parâmetros imunológicos (MMP-8, PGE2, NO em amostras de GCF) - baseline, 3, 7, 10 e 14 dias (PI e GI não foram avaliados nos dias 3 e 10)	ECR controlado por placebo, duplo-cego - Grupo probiótico e grupo placebo	18 pacientes saudáveis - média 38 anos	Losangos - 3 semanas (2 vezes ao dia)	<i>Lactobacillus brevis</i> CD2
Dhawan & Dhawan 2013  Gengivite	Parâmetros clínicos (PI, GI, calculo) - baseline, 14, 28 dias	ECR controlado por placebo, duplo-cego - Grupo B probiótico Grupo A placebo	36 pacientes saudáveis com gengivite crônica - média 21 anos	Comprimido - 2 semanas (2 vezes ao dia)	<i>Lactobacillus sporogenes</i> (100 milhões), <i>Streptococcus faecalis</i> PC (60 milhões), <i>Clostridium butyricum</i> TO-A (4 milhões), <i>Bacillus mesentericus</i> TO-A (2 milhões)
Iniesta <i>et al.</i> , 2012  Gengivite	Parâmetros clínicos (PI, GI) Parâmetros microbiológicos (amostras de saliva e subgengival) - baseline, 4 e 8 semanas (semanas 2, 4, 6, 8 monitorização colonização pelo probiótico)	ECR prospectivo cruzado, controlado por placebo, duplo-cego, Intervenção 4 semanas- washout 4 semanas- intervenção 4 semanas - Grupo probiótico e grupo placebo	40 pacientes saudáveis com gengivite - 20-24 anos	Comprimido - 4 semanas (1 vez por dia)	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM17938 e ATCC PTA5289 (2,9.10 <sup>8</sup> CFU)

O estudo de Kuru *et al.* (2017) (Tabela 4) avaliou o uso do probiótico *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* DN-173010 sobre as condições de saúde gengival após profilaxia profissional (remoção mecânica da placa). Nos 5 dias após a intervenção, os participantes não podiam higienizar os dentes. Após 28 dias de intervenção, nenhuma diferença foi observada entre os grupos teste e controle nos parâmetros clínicos analisados. Contudo, os resultados foram significativamente melhores em favor do grupo teste no dia 33 em todos os parâmetros clínicos avaliados ( $P < 0,001$ ). Além disso, no dia 33, os níveis de IL-1 $\beta$  (concentração média de IL-1 $\beta$  em pg/mL: controle 1267,05 $\pm$ 848,31 vs. teste 144,72 $\pm$ 97,21) e o volume do fluido crevicular gengival (GCF) (volume médio em  $\mu$ L: controle 0,33 $\pm$ 0,12 vs. teste 0,19 $\pm$ 0,07) foram superiores ( $P < 0,001$ ) no grupo controle o que sugere um efeito anti-inflamatório do probiótico. Uma limitação importante deste estudo foi o facto de não se terem efetuadas análises microbiológicas para avaliar a colonização do probiótico e estudar o seu potencial antimicrobiano *in vivo*.

O estudo de Yousuf *et al.* (2017a) (Tabela 4) avaliou a administração por 3 semanas de uma combinação probiótica (*Bifidobacterium longum*, *Lactobacillus acidophilus*, *Bifidobacterium bifidum*, *Bifidobacterium lactis* e *Bacillus* do ácido láctico) na saúde gengival em adolescentes. Os *scores* de PI e GI foram reduzidos até 2 semanas de intervenção no grupo probiótico e aumentaram progressivamente no grupo placebo ao longo do estudo (PI média *baseline*-1-2-3semanas: probiótico 2,90 – 2,79 – 2,68 – 2,90 vs. placebo 2,84 – 2,85 – 2,91 – 3,14; GI média *baseline*-1-2-3semanas : probiótico 1,53 – 1,45 – 1,36 – 1,52 vs. placebo 1,30 – 1,42 – 1,38 – 1,40).

Dhawan & Dhawan (2013) (Tabela 5) mostraram uma redução significativa do PI até 4 semanas (média PI  $\pm$ SD *baseline*-2-4semanas: probiótico 0,51 $\pm$ 0,03-0,05 $\pm$ 0,03-0,52 $\pm$ 0,032 vs. placebo 0,53 $\pm$ 0,04-0,41 $\pm$ 0,03-0,43 $\pm$ 0,04) com a combinação probiótica *Lactobacillus sporogenes*, *Streptococcus faecalis* PC, *Clostridium butyrium* TO-A, *Bacillus mesentericus* TO-A administrada em comprimidos em pacientes com gengivite quando comparado com o grupo placebo ( $P < 0,001$ ).

Deshmukh *et al.* (2017) (Tabela 4) e Nadkerny *et al.* (2015a) (Tabela 5) administraram uma combinação probiótica através de um bochecho por 2 semanas em condição de saúde gengival e gengivite respetivamente. Os grupos probióticos foram comparados com grupo usando chlorhexidina (CHX). Observou-se *scores* semelhantes

entre o grupo probiótico e o grupo CHX em ambos os estudos (Deshmukh *et al.* (2017): PI 7-14dias:  $P=1,277$ - $P=0,177$  e GI 7-14 dias:  $P=0,270$ - $P=0,092$ ; Nadkerny *et al.* (2015a): PI 15dias:  $P=0,16$  e GI 15dias  $P=0,75$ ). Isto sugere que a combinação probiótica utilizada promoveu uma redução da inflamação gengival e da acumulação de placa da mesma forma que a CHX. A combinação poderia servir como meio adjuvante no controlo da placa.

Alkaya *et al.* (2017) utilizou três modos de aplicação (Tabela 5) de probióticos *Bacillus subtilis*, *Bacillus megaterium*, *Bacillus pumilus* em pacientes com gengivite após a terapêutica mecânica e nenhuma diferença significativa foi observada entre o grupo probiótico e o grupo placebo ( $P>0,05$ ). A intervenção mecânica eliminou temporariamente a maior parte dos microrganismos patogénicos e controlou eficazmente a inflamação. As estirpes utilizadas não parecem conferir benefícios em caso de gengivite. Contudo, uma limitação neste estudo foi a falta de avaliação da colonização pelos probióticos, não se podendo refutar completamente a sua ineficácia, na medida em que a sua presença não foi confirmada. Também deve ser levado em consideração que a utilização de três modos de aplicação de probióticos é difícil de cumprir pelos pacientes, podendo dificultar a adesão e justificar a falta de significância nos resultados.

No estudo de Hallström *et al.* (2013) (Tabela 4) os autores concluíram que não houve benefícios clínicos, microbiológicos, imunológicos relevantes à administração de probióticos *L. reuteri* DSM17938 e ATCC PTA 5289 em casos de gengivite experimental em 18 mulheres saudáveis após o consumo por 3 semanas quando comparado com o grupo controlo. Pelo contrário, dois estudos mais recentes que avaliaram os efeitos da mesma combinação probiótica em pacientes com alterações sistémicas revelaram efeitos clínicos favoráveis. O ensaio clínico de Sabatini, Lauritano, Candotto, Silvestre, & Nardi (2017) (Tabela 5) teve como população de estudo 80 pacientes diabéticos do tipo II controlados em que houve redução dos *scores* de PI e GI em ambos os grupos (PI% *baseline*-30dias: probiótico:  $35\pm 8$ - $12\pm 3$  vs. placebo  $34\pm 6$ - $26\pm 4$ ) (GI% *baseline*-30dias: probiótico:  $52\pm 7$ - $15\pm 2$  vs. placebo:  $51\pm 5$ - $33\pm 7$ ). A redução foi maior no grupo probiótico e significativa aos 30 dias (PI:  $P<0,05$  e GI:  $P<0,005$ ). O ensaio de Schlagenhauf *et al.* (2016) (Tabela 5) efetuado em 45 grávidas também mostrou uma redução significativa ( $P<0,0001$ ) dos parâmetros clínicos e até uma resolução completa dos locais com inflamação leve. A combinação de *L. reuteri* não afetou os níveis séricos

normais de TNF- $\alpha$  talvez porque as variações fisiológicas durante a gravidez podem camuflar as variações das citocinas. Sabendo que as citocinas estão concentradas no GCF e diluídas no sangue periférico, estudar os níveis séricos de TNF- $\alpha$  pode não ter sido a escolha correta para avaliar o efeito oral dos probióticos sobre este parâmetro imunológico (Schlagenhauf *et al.*, 2016). Tendo em conta as limitações destes estudos, os resultados sugerem que a terapia com probióticos *L. reuteri* pode ser um meio valioso na gestão da gengivite em pacientes diabéticos e grávidas que são mais suscetíveis à gengivite e às infeções orais em geral (Sabatini *et al.*, 2017) (Schlagenhauf *et al.*, 2016).

M. K. Keller *et al.* (2018) (Tabela 4) estudaram a administração de comprimidos de *Lactobacillus rhamnosus* e *Lactobacillus curvatus* em pacientes com gengivite e revelaram uma redução significativa ( $P < 0,05$ ) do sangramento gengival e do volume do GCF sem notar alteração aos níveis de citocinas após 4 semanas de consumo quando comparado com os dados iniciais ( $P > 0,05$ ). Nenhuma diferença entre o grupo teste e o grupo placebo foi observada pelos autores no fim da intervenção.

O estudo de Lee, Kim, Ko, Ouwehand, & Ma (2015) (Tabela 5) avaliou os efeitos do *Lactobacillus brevis* CD2 em caso de gengivite experimental. Os *scores* de PI e GI aumentaram em ambos os grupos ( $P = 0,001$  no grupo probiótico e  $P < 0,001$  no grupo placebo). O grupo placebo apresentou valores crescentes de sangramento gengival à sondagem (BOP) durante os períodos em avaliação (BOP *baseline*-10-14 dias: 9,50-14,75-14,81;  $P < 0,05$ ). Diferenças significativas ao nível de BOP foram encontradas no dia 10 ( $P = 0,016$ ) a favor do grupo probiótico mas já não no dia 14 para BOP ( $P = 0,194$ ) sugerindo que esta estirpe consegue retardar o aparecimento de gengivite durante um curto período de tempo. Consistente com isto, houve um aumento progressivo do óxido nítrico (NO), um mediador inflamatório, no GCF do grupo placebo (*baseline*: 7274,2  $\mu\text{mol/mL}$  – dia 3: 102267,7  $\mu\text{mol/mL}$  ( $P = 0,04$ ) – dia 14: 10651,5  $\mu\text{mol/mL}$  ( $P = 0,049$ )) ao contrário do grupo probiótico em que não houve mudança. A estirpe não influenciou os valores de metaloproteases-8 (MMP-8) e prostaglandina E2 (PGE2) (não houve diferença entre os grupos  $P > 0,05$ ).

O estudo de Alanzi *et al.* (2018) (Tabela 4) que avaliou a administração por 4 semanas de pastilha probiótica contendo *Lactobacillus rhamnosus*, *Bifidobacterium lactis* a adolescentes com saúde gengival, mostrou resultados promissores da ação

antimicrobiana destes agentes. Houve uma diminuição significativa na contagem de *A. actinomycetancomitans* e *F. nucleatum* na saliva ( $P=0,014$  e  $P<0,001$  respetivamente) e na placa ( $P=0,036$  e  $P=0,002$  respetivamente), bem como uma redução de *P. gingivalis* na placa ( $P=0,014$ ) no grupo teste. As variações do PI não revelaram qualquer melhoria em favor do grupo probiótico ( $P=0,819$ ) ao contrário do GI ( $P=0,012$ ).

Montero *et al.* (2017) (Tabela 5) avaliaram a administração durante 6 semanas de comprimidos contendo *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Peiococcus acidilactici* em casos de gengivite. As variações de PI e GI não revelaram qualquer melhoria em favor do grupo probiótico ( $P>0,05$ ), os *scores* diminuíram em ambos os grupos [PI (média $\pm$ SD) *baseline*-6 semanas: probiótico 1,6 $\pm$ 0,2–1,22 $\pm$ 0,2 vs. placebo: 1,55 $\pm$ 0,2–1,08  $\pm$ 0,3); GI *baseline*-6semanas: probiótico 1,65 $\pm$ 0,3 – 0,6 $\pm$ 0,2 vs. placebo: 1,62 $\pm$ 0,2 – 0,54 $\pm$ 0,3)]. Contudo no grupo probiótico detetaram-se mais locais com inflamação leve-moderada (número médio de locais por paciente com GI=1 e GI=2: 40 e 56 respetivamente) do que severa (GI=3: 2,5) e observou-se uma redução significativa dos *scores* de inflamação gengival severa quando comparado com o placebo ( $P=0,0418$ ). Ademais os locais com *scores* de inflamação moderada foram reduzidos de 56 locais em média por paciente para 4 após o período de intervenção probiótica ( $P<0,0001$ ). Os autores correlacionaram a diminuição de *A. actinomycetancomitans* com a diminuição do GI médio ( $P=0,0020$ ) e a diminuição de *T. forsythia* com a redução dos *scores* de inflamação severa ( $P<0,0001$ ). Em conclusão esta combinação probiótica de *Lactobacillus plantarum*, *Lactobacillus brevis*, *Peiococcus acidilactici* foi eficaz na redução dos *scores* mais elevados de inflamação gengival.

As estirpes DSM17938 e ATCC PTA5289 de *L. reuteri* administradas em comprimidos em pacientes com gengivite no estudo cruzado de Iniesta *et al.* (2012) (Tabela 5) permitiram uma redução significativa no grupo teste da contagem salivar de anaeróbios totais após 4 semanas de intervenção ( $P=0,021$ ) e de *P. intermedia* após 4 ( $P=0,08$ ) e 8 semanas ( $P=0,03$ ). Houve ainda uma diminuição significativa de *P. gingivalis* em amostra subgengival até 4 semanas quando comparado com o grupo controlo ( $P=0,008$ ). Estes resultados sublinharam o efeito antimicrobiano dos agentes probióticos utilizados, podendo ser explicado pelo facto de que os probióticos co-agregam com as espécies patogénicas, deslocando-as do biofilme (Dhawan & Dhawan, 2013). Neste estudo os PI e GI foram semelhantes entre os grupos ( $P>0,05$ ), impedindo a

associação dos dados microbiológicos com a clínica. Iniesta *et al.* (2012) avaliaram ainda a colonização pelo *L. reuteri* e verificaram que a colonização temporária da saliva foi maior (aumentou progressivamente e foi detetada até às 8 semanas), mas menos duradoura do que os tecidos subgengivais (pelo menos 14 semanas). A análise por PCR de 160 amostras salivares indicou a presença mais frequente de *L. reuteri* ATCC PTA 5289 (detetada em 44 amostra) em comparação com a estirpe de *L. reuteri* DSM17938 (detetada em 17 amostras). Resultados ainda mais marcados foram obtidos em número idêntico de amostras subgengivais (*L. reuteri* ATCC PTA 5289 foi detetada em 41 mostras e *L. reuteri* DSM17938 em 4 amostras). No entanto, no grupo probiótico, 5 pessoas não apresentaram *L. reuteri* na saliva e 6 nos tecidos gengivais, indicando que as variações inter-individuais influenciam a colonização por este probiótico.

O conjunto dos resultados desses ensaios sugerem que os probióticos utilizados podem servir de auxiliar na higiene oral e promover a saúde oral, quer em indivíduos com saúde gengival quer em indivíduos com gengivite. Este efeito é mais expressivo quando não há remoção mecânica do biofilme [Alanzi *et al.* (2018), Dhawan & Dhawan (2013), Nadkerny *et al.* (2015a), Sabatini *et al.* (2017), Schlagenhauf *et al.* (2016), Yousuf *et al.* (2017a)] do que quando há controlo mecânico da placa [Alkaya *et al.* (2017)].

Os resultados sugerem que a colonização pelos probióticos deve ser estudada em períodos de tempo prolongados porque estes agentes podem apresentar efeitos positivos a longo prazo que não são detetáveis em estudo de curto prazo. Ensaio devem ser realizados com populações maiores em todas as faixa-etárias para obter resultados mais representativos e conseguir generalizá-los à população geral (Alanzi *et al.*, 2018)(M. K. Keller *et al.*, 2018). Contudo, não se sabe realmente se os probióticos precisam de colonizar a cavidade oral para provocar um efeito benéfico na flora oral (Iniesta *et al.*, 2012).

As conclusões inconsistentes sobre a eficácia dos probióticos na saúde gengival e gengivite podem estar associadas a problemas no desenho e execução dos estudos ao nível da seleção da estirpe bacteriana (nem todas têm uma utilidade na gengiva) (Montero *et al.*, 2017) e dosagem (as baixas concentrações podem não ser eficazes) (Alkaya *et al.*, 2017). Por outro lado, o efeito *Hawthorne* (viés de atenção do indivíduo) (French, J. R. 1953) pode supervalorizar os efeitos clínicos dos probióticos utilizados e a deteção dos microrganismos por PCR pode sobrestimar as reais quantidades de microrganismos viáveis presentes na boca (Montero *et al.*, 2017; Yousuf *et al.*, 2017a). Não obstante estas

limitações, os resultados obtidos até aqui são promissores, uma vez que indicam que os probióticos têm potencial para interagir com o hospedeiro de maneira favorável, são compatíveis com a microbiota residente, têm a capacidade de modular o biofilme desequilibrado (Hallström *et al.*, 2013) e são seguros para o hospedeiro (Iniesta *et al.*, 2012; Lee *et al.*, 2015).

## ii. Periodontite

A expansão das bactérias periodontopatogénicas, leva ao aparecimento de periodontite. As bactérias responsáveis pela periodontite são principalmente *P. gingivalis*, *T. forsythia* (fazem parte do complexo vermelho), *P. intermedia* e *A. actinomycetacomitans*, (Invernici *et al.*, 2018; Penala *et al.*, 2016) e ainda espécies de *Fusobacterium* e de *Spirochetes* (Shah *et al.*, 2013). O tratamento convencional da periodontite passa pela remoção mecânica da placa subgengival. O alisamento radicular (SRP) é considerado o meio padrão de controlo (Invernici *et al.*, 2018; Penala *et al.*, 2016) e pode ser reforçado pela adição de antibióticos, no entanto, várias desvantagens lhe são atribuídas: risco de resistência, maior vulnerabilidade do hospedeiro, modificações da flora comensal e risco de disbiose (Ikram *et al.*, 2019; Morales *et al.*, 2018; Sajedinejad *et al.*, 2018). Os fatores do hospedeiro e a etiologia polimicrobina explicam as recidivas, e recolonização pelos patogénicos (Morales *et al.*, 2018; Teughels *et al.*, 2013). Por outro lado, a remoção da placa pode ser difícil de realizar em locais difíceis de acesso, e os microrganismos permanecem e invadem os tecidos adjacentes (mucosa, língua, amígdalas) e podem provocar novas infeções por translocação (Iwasaki *et al.*, 2016; Shah *et al.*, 2013). A periodontite deve ser analisada de um ponto de vista não só clínico e microbiológico, mas também imunológico porque a remodelação da matriz extracelular depende do equilíbrio entre as MMPs (enzimas proteolíticas responsáveis pela degradação e remodelação das proteínas da matriz extracelular, presentes na saliva, placa dentária e GCF) e TIMPs (inibidor tecidual das MMPs, o TIMP-1 e TIMP-2, envolvidos em danos periodontais). Em caso de doenças periodontais, um desequilíbrio na relação desses fatores (exs. redução TIMP-1 e aumento MMP-8-9) leva a destruição do periodonto, principalmente pela MMP-8 (colagenase, degrada o colagénio tipo 1, o mais abundante nos tecidos periodontais) (Ince *et al.*, 2015a) (Jäsberg *et al.*, 2018). Os probióticos foram propostos como auxiliares da terapia mecânica da periodontite tendo como objetivos restaurar a microbiota e reduzir a inflamação (Ikram *et al.*, 2019; Sajedinejad *et al.*, 2018). Vários ensaios utilizaram o género *Lactobacillus* porque é uma

bactéria comensal que antagoniza o *P. gingivalis* (Penala *et al.*, 2016) (Vicario *et al.*, 2013). Para esta revisão foram selecionados 17 ensaios clínicos randomizados relacionados com a implementação de probióticos em condições periodontais.



Tabela 6 : Características gerais dos ECR's relacionados com a periodontologia (periodontite)

Descrição dos ECR's relacionados com a periodontologia (periodontite)					
Referência Condição oral	Parâmetros avaliados Tempo de avaliação	Desenho estudo Grupos de estudo	Tamanho amostra (no fim do estudo) Idade ou faixa-etária	Protocolo da implementação de probiótico(s): Veículo Tempo de administração	Estirpe(s) probiótica(s) utilizada(s)
<b>Ikram et al., 2019</b>  <b>Periodontite crônica</b>	Parâmetros clínicos (PI, BOP, CAL, PD) - baseline, 6 e 12 semanas	ECR - Grupo A: SRP + ATB (amoxicilina 500mg + metronidazol 400mg 3x/dia durante 7 dias) Grupo B: SRP + probiótico	30 pacientes saudáveis com periodontite crônica generalizada - idade média >30anos	Escovar com pó misturado com água - 3 meses (2 vezes ao dia)	<i>Lactobacillus reuteri</i> (1,2 bilhões)
<b>Murugesan et al., 2018</b>  <b>Periodontite agressiva</b>	Parâmetros clínicos (OHI-S, GI, BOP, PD, CAL) - baseline, 4, 8, 12 semanas	ECR controlado por placebo, duplo-cego - Grupo teste: SRP + ATB + simbiótico Grupo controle: SRP + ATB + placebo  Nota: ATB = doxiciclina 100mg 2x/dia no 1º dia seguido de 100mg 1x/dia durante 1 semana	60 pacientes com periodontite agressiva - 18-30 anos	Losango - 8 semanas (2 vezes ao dia)	<i>Clostridium butyricum</i> TO-A (2 milhões), <i>Bacillus mesentericus</i> TO-A JPC (1 milhão), <i>Lactobacillus sporogenes</i> (50 milhões), pré-biótico <i>Streptococcus faecalis</i> T-110 JPC (30 milhões)
<b>Invernici et al., 2018</b>  <b>Periodontite crônica</b>	Parâmetros clínicos (PI, BOP, PD, CAL, GR), imunológicos (IL-1β, IL-10, IL-8 no GCF), microbiológicos (amostras placa subgingival em bolsas moderadas 4-6mm e profundas >7mm: 40 espécies bacterianas subgingivais avaliadas) - baseline, 30, 90 dias	ECR controlado por placebo - Grupo teste: SRP + probiótico Grupo controle: SRP + placebo	41 pacientes saudáveis com periodontite crônica generalizada - > 30 anos	Pastilha - 30 dias (2 vezes ao dia)	<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> HN019 (10 <sup>9</sup> CFU)
<b>Sajedinejad et al., 2018</b>  <b>Periodontite crônica</b>	Parâmetros clínicos (PI, GI, BOP, PD) - baseline, 14, 28 dias	ECR controlado por placebo, duplo-cego - Grupo teste: SRP + probiótico Grupo controle: SRP + placebo	40 pacientes saudáveis com periodontite crônica moderada a grave (PD ≥4 mm, CAL ≥3 mm, perda óssea ≥3 mm) - 24-52 anos	Bochecho 20mL - 28 dias (2 vezes ao dia)	<i>Lactobacillus salivarius</i> NK02 (10 <sup>8</sup> CFU)
<b>Morales et al., 2018</b>  <b>Periodontite crônica</b>	Parâmetros clínicos (CAL, BOP, PI), microbiológicos (amostras placa subgingival em 4 sítios periodontais (1 em cada quadrante) com CAL >1mm, PD >4mm e BOP) - baseline, 3, 6 e 9 meses	ECR controlado, duplo-cego - Grupo antibiótico (azitromicina 500mg 1xdia durante 5 dias) Grupo placebo Grupo probiótico	47 pacientes saudáveis com periodontite crônica - > 35 anos	Comprimido - 3 meses (1 vez por dia)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> SP1 (2.10 <sup>7</sup> CFU)

Tabela 7 : Características gerais dos ECR's relacionados com a periodontologia (periodontite)

Descrição dos ECR's relacionados com a periodontologia (periodontite)					
Referência Condição oral	Parâmetros avaliados Tempo de avaliação	Desenho estudo Grupos de estudo	Tamanho amostra (no fim do estudo) Idade ou faixa-etária	Protocolo da implementação de probiótico(s): Veículo Tempo de administração	Estirpe(s) probiótica(s) utilizada(s)
Malik <i>et al.</i> , 2017  Periodontite crônica	Parâmetros clínicos (PI, GI, PD), microbiológicos - baseline e 21 dias	ECR controlado por placebo - Grupo teste: SRP + probiótico Grupo controle: SRP + placebo	20 pacientes com periodontite crônica - 18-45 anos	Irrigação intra-bolsa - 1 vez	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus sporogenes</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Lactobacillus rhamnosus</i> , <i>Saccharomyces boulardii</i>
Chandra <i>et al.</i> , 2016  Periodontite crônica	Parâmetros clínicos (PD, CAL, PI, GI) Viabilidade do probiótico na bolsa (dias 0, 2, 4, 7, 14) - baseline, 1 semana, 3 e 6 meses	ECR controlado por placebo - Grupo teste: SRP + probiótico (1º local) Grupo controle: SRP + placebo (2º local)	30 pacientes com periodontite crônica pelo menos 2 bolsas PD>5mm e pelo menos 1 bolsa em cada quadrante - 25-50 anos	Pó 1g mistura – N/A	<i>Saccharomyces boulardii</i> (5 bilhões CFU) com frutooligosacarídeo pré-biótico
Penala <i>et al.</i> , 2016  Periodontite crônica e halitose	Parâmetros clínicos (PI, GI, BOP, PD, CAL, CAG), microbiológicos (amostras subgingivais, BANA) Halitose (ORG) - baseline, 1 e 3 meses (PD e CAL só baseline e 3 meses)	ECR controlado por placebo, duplo-cego - Grupo teste: SRP + probiótico Grupo controle: SRP + placebo	29 pacientes saudáveis com periodontite crônica pelo menos 4 dentes com PD ≥ 5 mm, CAL ≥ 4 mm, e com halitose clinicamente perceptível - 25-59 anos	Subgingival (após SRP, semanas 1, 2, 4) e bochecho (14 dias, 2 vezes ao dia)	<i>Lactobacillus salivarius</i> , <i>Lactobacillus reuteri</i> (2.10 <sup>6</sup> CFU cada)
Iwasaki <i>et al.</i> , 2016  Periodontite crônica (TPS)	Parâmetros clínicos (PI, GI, BOP, PD) - baseline, 4, 8, 12 semanas	ECR controlado por placebo, duplo-cego - Grupo probiótico e grupo placebo	36 pacientes em fase TPS após periodontite crônica, com uma ou mais bolsas periodontais iniciais ≥ 4mm e ter completado o tratamento - média 66,2 anos	Capsula - 12 semanas (1 vez por dia)	<i>Lactobacillus plantarum</i> L-137
Imran <i>et al.</i> , 2015  Periodontite crônica	Parâmetros clínicos (PI, GI), microbiológicos (amostra placa subgingival: <i>P. gingivalis</i> , <i>P. intermedia</i> , <i>A. actinomycetacomitans</i> ) - baseline, 1 e 2 meses	ECR - Grupo probiótico e grupo controle	42 pacientes saudáveis com periodontite crônica leva a moderada generalizada - 20-50anos	Leite - 1 mês (1 vez por dia)	<i>Lactobacillus casei</i> (6,5 bilhões-10 <sup>8</sup> CFU/mL)
Ince <i>et al.</i> , 2015  Periodontite crônica	Parâmetros clínicos (PI, GI, BOP, PD, CAG), imunológicos (MMP-8, TIMP-1 através do GCF em 2 dentes com 8 locais) - baseline. 21. 90. 180. 360dias	ECR paralelo, controlado por placebo, duplo- cego - Grupo teste: SRP + probiótico Grupo controle: SRP + placebo	30 pacientes com periodontite crônica, perda óssea horizontal detetada radiograficamente e com pelo menos 2 dentes com local proximal. cada um com PD 5-7mm e GI>2 em cada quadrante - 35-50 anos	Pastilha - 3 semanas (2 vezes ao dia)	<i>Lactobacillus reuteri</i>

Tabela 8 : Características gerais dos ECR's relacionados com a periodontologia (periodontite)

Descrição dos ECR's relacionados com a periodontologia (periodontite)					
Referência Condição oral	Parâmetros avaliados Tempo de avaliação	Desenho estudo Grupos de estudo	Tamanho amostra (no fim do estudo) Idade ou faixa-etária	Protocolo da implementação de probiótico(s): Veículo Tempo de administração	Estirpe(s) probiótica(s) utilizada(s)
<b>Laleman et al., 2015</b>  <b>Periodontite</b>	Parâmetros clínicos (PD, BOP, CAL, GI, PI, REC), microbiológicos (amostras placa supragengival, subgengival, saliva e língua) - baseline, 12, 24 semanas	ECR controlado por placebo, duplo-cego - Grupo teste: SRP + probiótico Grupo controle: SRP	48 pacientes saudáveis com periodontite moderada a severa - 37-58 anos	Comprimido - 12 semanas (2 vezes ao dia)	<i>Streptococcus oralis</i> KJ3, <i>Streptococcus uberis</i> KJ2, <i>Streptococcus rattus</i> JH145
<b>Tekce et al., 2015</b>  <b>Periodontite crônica</b>	Parâmetros clínicos (PI, GI, BOP, PD, CAL), microbiológicos (pelo menos dois dentes com um local proximal com um PD de 5-7 mm e um GI de $\geq 2$ em cada quadrante ; contagem total de células viáveis e proporções de bactérias anaeróbicas obrigatórias) - 2, 21, 90, 180, 360 dias	ECR controlado, duplo-cego - Grupo teste: SRP + probiótico Grupo controle: SRP + placebo	40 pacientes com periodontite crônica com pelo menos dois dentes com um local proximal, cada um com PD 5-7 mm e GI $\geq 2$ em cada quadrante e perda óssea horizontal detetada radiograficamente - 35-50 anos	Pastilha - 3 semanas (2 vezes ao dia)	<i>Lactobacillus reuteri</i>
<b>Szkaradkiewicz et al., 2014</b>  <b>Periodontite crônica</b>	Parâmetros clínicos (PI, GI, CAL, PD), imunológicos (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ e IL-17 amostras de GCF) - N/A	ECR - Grupos probiótico e controle	38 pacientes saudáveis com periodontite crônica moderada - 31-46 anos	Comprimido - (2 vezes ao dia)	<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCU PTA 5289 ( $10^8$ CFU)
<b>Vicario et al., 2013</b>  <b>Periodontite crônica</b>	Parâmetros clínicos (PI, GI, PD 4-5mm, PD > 6mm) - baseline, 30 dias	ECR controlado por placebo, duplo-cego - Grupo probiótico e grupo placebo	19 pacientes saudáveis com periodontite crônica leva a moderada - média 55 anos	Comprimido - 30 dias (1 vez por dia)	<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC 55730 e ATCCPTA 5289 ( $2.10^8$ células vivas)
<b>Teughels et al., 2013</b>  <b>Periodontite crônica</b>	Parâmetros clínicos (PD, REC, BOP, GI, PI, CAL), microbiológicos (amostras saliva, placa subgengival e supragengival) - baseline, 3, 6, 9, 12 semanas	ECR controlado por placebo, cego - Grupo teste: SRP + probiótico Grupo controle: SRP + placebo	30 pacientes saudáveis com periodontite crônica moderada a grave generalizada - > 35 anos	Losango - 12 semanas (1 vez por dia)	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM17938 e ATCC PTA5289 ( $9.10^8$ CFU cada)
<b>Shah et al., 2013</b>  <b>Periodontite agressiva</b>	Parâmetros clínicos (PI, GI, PD, CAL), microbiológicos (amostras de saliva) - baseline, 2 semanas, 2 meses	ECR - Grupo A: probiótico Grupo B: probiótico + doxiciclina 100mg (1x/dia durante 14 dias) Grupo C: doxiciclina 100mg 1x/dia durante 14 dias	30 pacientes com periodontite agressiva - 14-35 anos	Losango - 14 dias (2 vezes ao dia)	<i>Lactobacillus brevis</i> CD2 ( $10^8$ CFU)

O estudo de Vicario *et al.* (2013) (Tabela 8) avaliou a administração de comprimidos contendo *L. reuteri* ATCC 55730 e *L. reuteri* ATCCPTA 5289 em pacientes com periodontite crônica durante 30 dias. Todos os parâmetros clínicos melhoraram no grupo teste ( $P<0,05$ ), sugerindo uma possível sinergia entre as estirpes utilizadas.

Imran *et al.* (2015) (Tabela 7) administraram *Lactobacillus casei* em leite durante 1 mês em pacientes com periodontite crônica. Neste caso, os parâmetros clínicos não foram melhorados durante e após o período de intervenção ( $P>0,05$ ). Em termos microbiológicos, *P. gingivalis* diminuiu muito significativamente nos primeiros meses ( $P<0,001$ ), ao contrário de *A. actinomycetancomitans* e *P. intermedia* que não mostraram redução significativa ( $P>0,05$ ).

Iwasaki *et al.* (2016) (Tabela 7) avaliaram o uso do probiótico *Lactobacillus plantarum* em pacientes em fase de “terapia periodontal de suporte” (TPS) durante 12 semanas. O controlo mecânico da placa bacteriana associado ao TPS foi efetuado consoante as visitas de controlo (*baseline*, 4, 8 e 12 semanas) e melhorou os parâmetros clínicos em ambos os grupos. A diminuição significativa a favor do grupo probiótico foi observada às 12 semanas, nos parâmetros seguintes: BOP ( $P=0,022$ ) e bolsas  $>4\text{mm}$  (número de dentes com PD  $>4$  ( $P=0,001$ ) e número de sítios com PD  $>4\text{mm}$  ( $P=0,006$ )). Estes resultados sugerem que estes probióticos ingeridos de maneira contínua podem prevenir uma eventual recidiva e/ou progressão da doença.

A eliminação dos microrganismos periodontopatogénicos por remoção mecânica é temporária, pelo que vários estudos avaliaram a eficácia de probióticos como adjuvante da terapia mecânica. Malik *et al.* (2017) (Tabela 7) (Figuras 4 e 5) testaram numa única aplicação subgingival uma combinação probiótica de *L. acidophilus*, *L. sporogenes*, *Bifidobacterium longum*, *L. rhamnosus* e *Saccharomyces boulardii* em pacientes com periodontite crônica. Quando comparado com o grupo controlo, houve melhoria significativa dos parâmetros clínicos (GI, PD) e microbiológicos (contagem bacteriana em CFU/mL) ( $P<0,05$ ) no grupo probiótico no dia 21, com exceção do PI ( $P>0,05$ ).

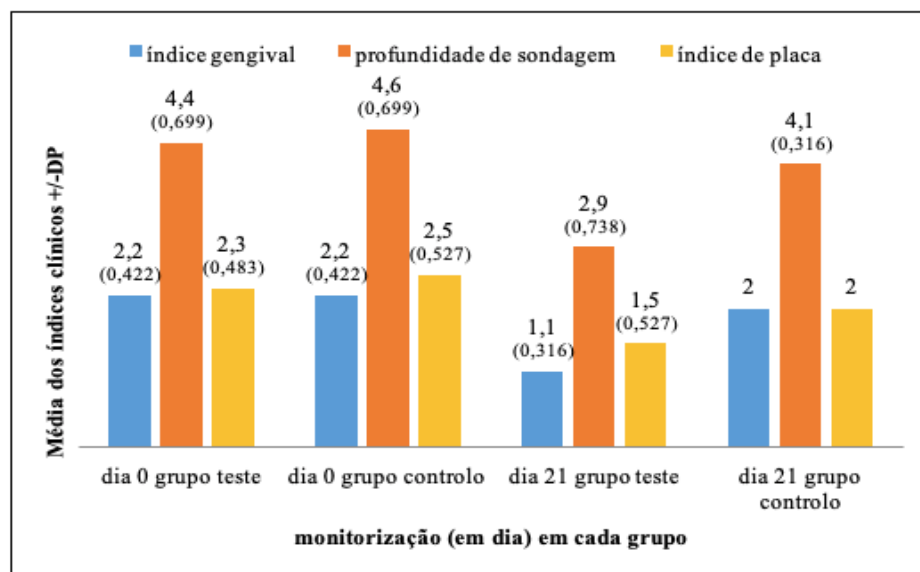


Figura 4 : Parâmetros clínicos antes e após aplicação subgengival de probióticos como adjuvante à terapia mecânica tal como presente em Malik *et al.* (2017). DP-desvio padrão

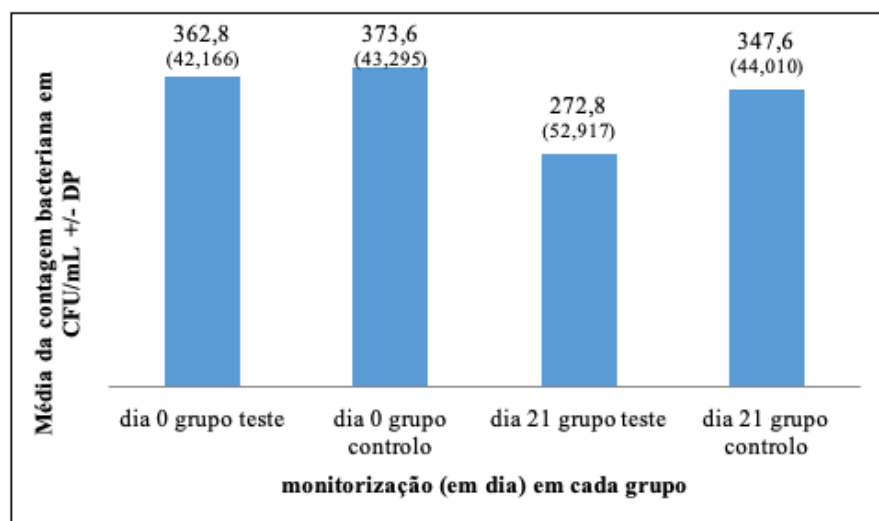


Figura 5 : Contagem bacteriana antes e após aplicação subgengival de probióticos como adjuvante à terapia mecânica tal como presente em Malik *et al.* (2017). DP-desvio padrão

Penala *et al.* (2016) (Tabela 7) avaliaram a aplicação subgengival (no dia do SRP, após 1, 2 e 4 semanas) e implementação por bochecho (durante 14 dias) de *L. salivarius* e *L. reuteri* em pacientes com periodontite crônica. Houve uma diferença significativa no grupo teste aos 3 meses nos parâmetros clínicos quando comparado com os dados basais ( $P < 0,05$ ). Nenhuma diferença significativa entre os grupos foi observada aos 3 meses no que diz respeito ao nível de inserção e profundidade das bolsas, exceto em bolsas moderadas ( $P < 0,05$ ). No que diz respeito a análise do BANA (*N*-benzoyl- *DL*-arginine-*naphthylamide*), a redução foi significativa no grupo teste após 1 mês ( $P < 0,001$ ), em comparação com o grupo controle, mas esta diferença foi temporária (aos 3 meses já não

se observa) porque os nichos foram rapidamente recolonizados mesmo na presença dos probióticos. Os autores consideraram que esta combinação probiótica reforçou a terapia mecânica nas bolsas moderadas.

Chandra *et al.* (2016) (Tabela 7) aplicaram a nível subgingival uma combinação de probióticos *Saccharomyces boulardii* com pré-biótico (fruto-oligossacarídeo) em pacientes com periodontite crônica como adjuvante ao SRP. Aos 3 e 6 meses após o tratamento mecânico houve uma redução significativa dos PI ( $P=0,0001$  e  $P=0,002$ , respectivamente) e GI ( $P=0,025$  e  $P=0,0001$ , respectivamente), CAL ( $P=0,049$  e  $P=0,0001$ , respectivamente) e PD ( $P=0,025$  e  $P=0,0001$ , respectivamente) no grupo teste. A colonização pelo *Saccharomyces boulardii* foi de curta duração [até dia 4 ( $P=0,0001$ ); dia 7  $P=0,811$ ]. Contudo, *S. boulardii* pode ser um bom candidato como agente probiótico auxiliar no tratamento da periodontite crônica.

Shah *et al.* (2013) (Tabela 8) efetuaram no dia 0 um SRP em pacientes com periodontite agressiva e constituíram 3 grupos em que implementaram durante 14 dias: *L. brevis* CD2 (grupo A) – *L. brevis* CD2 e doxiciclina (grupo B) – e doxiciclina (grupo C). Após 2 semanas, o grupo B mostrou uma redução significativamente maior da PD quando comparado com os outros grupos ( $3,75 \pm 0,72$  para  $3,71 \pm 0,29$ ,  $P < 0,05$ ). Aos 2 meses de monitorização todos os grupos tiveram os parâmetros clínicos melhorados de maneira significativa quando comparado com o *baseline* ( $P < 0,05$ ) sem evidenciar diferença significativa entre eles ( $P > 0,05$ ). A contagem de *Lactobacillus spp.* (CFU/mL) aumentou significativamente até às 2 semanas de monitorização no grupo B e até os 2 meses no grupo A ( $P < 0,05$ ). Não houve redução significativa de *A. actinomycetacomitans* ( $P > 0,05$ ). Uma limitação deste estudo foi não ter analisado *in vivo* o NO sabendo-se que o *L. brevis* CD2 tem um mecanismo de ação anti-inflamatório *in vitro* pela inibição da produção do NO. Em conclusão, *L. brevis* CD2 combinado com doxiciclina trouxe melhorias em termos de PD em pacientes com periodontite agressiva, parecendo ser um bom adjuvante a terapia mecânica.

Morales *et al.* (2018) (Tabela 6) estudaram a administração por 3 meses de *L. rhamnosus* SP1 em paciente com periodontite crônica. Formaram 3 grupos: grupo antibiótico (azitromicina), grupo *L. rhamnosus* SP1 e grupo placebo. Os desfechos

clínicos e microbiológicos melhoraram significativamente ao longo do período de estudo ( $P<0,05$  e  $P<0,017$ ).

Ikram *et al.* (2019) (Tabela 6) compararam o *L. reuteri* com o metronidazol como adjuvante ao SRP em pacientes com periodontite crônica. Houve melhora significativa nos parâmetros clínicos ( $P<0,001$ ) em todos os tempos da avaliação, sem haver diferença entre os grupos ( $P>0,05$ ), o que indica que a eficácia tanto do probiótico como do antibiótico foi semelhante.

A utilização de *Streptococcus oralis* KJ3, *Streptococcus uberis* KJ2, *Streptococcus rattus* JH145 por 12 semanas em pacientes com periodontite no estudo de Laleman *et al.* (2015) (Tabela 8) revelou resultados microbiológicos e clínicos similares entre o grupo placebo (SRP) e o grupo teste (SRP + probiótico) ao longo do período de monitorização ( $P>0,1$ ). As únicas diferenças observadas a favor do grupo teste foram um menor PI no final da monitorização ( $P=0,0024$  as 24 semanas), e houve uma diminuição de *P. intermedia* salivar às 12 semanas ( $P=0,02$ ). Os investigadores concluíram que as melhorias resultaram da terapia mecânica concomitante.

Em pacientes com periodontite agressiva, Murugesan, Sudha, Subaramoniam, Dutta, & Dhanasekar (2018) (Tabela 6) avaliaram a eficácia da co-administração de doxiciclina e pastilha simbiótica (composta por: prébiotico *Streptococcus faecalis* T-110 JPC e probióticos *Clostridium butyricum* TO-A, *Bacillus mesentericus* TO-A JPC e *L.sporogenes*) em comparação com placebo, como adjuvante ao SRP. No grupo teste houve uma diminuição significativa ( $P<0,01$ ) da PD quando comparado com o início (5,6 mm para 3,10mm). O nível de inserção clínico (CAL) do grupo teste quando comparado com o grupo placebo diminuiu significativamente no fim da intervenção (5+/-0,53mm vs. 5,37+/-0,72mm) ( $P<0,01$ ). Quatro semanas após o fim da intervenção, no grupo teste, observou-se uma redução significativa da PD, do CAL e do BOP ( $P<0,01$ ). Conclui-se que esta mistura prébiotica-probiótica pode ser um complemento à remoção mecânica e ao uso de doxiciclina para melhorar os parâmetros clínicos, reduzir a carga bacteriana e repovoar o nicho tratado (Murugesan *et al.*, 2018).

Os ensaios de Ince *et al.* (2015) (Tabela 7), Tekce *et al.* (2015), Szkaradkiewicz, Stopa, & Karpiński (2014) e Teughels *et al.* (2013) (Tabela 8) estudaram *L. reuteri* em

pacientes com periodontite crônica com veículo e duração de administração diferentes. Os estudos de Tekce *et al.* (2015), İnce *et al.* (2015) tiveram desenho de estudo comparáveis (administração durante 3 semanas de pastilhas probióticas contendo *L. reuteri* comparada com o placebo) e alcançaram resultados muitos parecidos. Tekce *et al.* (2015) observaram que todos os parâmetros clínicos foram significativamente reduzidos durante o período de estudo ( $P < 0,001$ ) (sobretudo as bolsas moderadas e profundas com,  $P = 0,049$  e  $P = 0,024$ , respetivamente) tal como os parâmetros microbiológicos (evidenciaram um atraso da recolonização até 6 meses  $P < 0,05$ ). Mais pacientes do grupo placebo tiveram que efetuar cirurgia complementar ( $P < 0,05$ ), o grupo probiótico teve menos pacientes com alto risco de progressão e mais pacientes com baixo risco. O probiótico foi encontrado até ao dia 90 em 11 pacientes, ( $P = 0,02$ ) e já não o foi no dia 180 indicando colonização temporária. İnce *et al.* (2015) referiram que os parâmetros clínicos diminuíram significativamente e permaneceram estáveis durante todo o estudo ( $P < 0,05$ ) quando comparado com o grupo controlo. Por exemplo o PD reduziu 1,70mm no grupo teste e de 0,55mm no controlo e CAL aumentou 1,39mm no grupo teste e 0,43mm no grupo placebo. Resultados significativos de ganho de inserção foram observados até um ano no grupo teste ( $P < 0,001$ ). Em termos imunológicos, até ao dia 180, o TIMP-1 aumentou e, o MMP-8 e volume GCF reduziram ( $P < 0,05$ ) em ambos os grupos, o que é consistente com a redução da inflamação e respostas positivas dos tecidos à remoção mecânica da placa. Contudo os valores voltaram para valores iniciais ao dia 360. Teughels *et al.* (2013) mostraram uma redução mais pronunciada de PD nas bolsas moderadas e profundas ( $P < 0,05$ ), e menor número de locais com PD  $> 5$  ou 6 mm ( $P < 0,05$ ) no grupo teste quando comparado com o grupo controlo ao fim das 12 semanas de intervenção. Houve menos recessões ao fim da intervenção ( $P < 0,05$ ) no grupo que recebeu o probiótico. O grupo teste também teve menos pacientes com um alto risco de progressão da doença e mais com baixo risco ( $P < 0,027$ ). Em termos microbiológicos, *P. gingivalis* teve contagens significativamente reduzidas as 12 semanas a nível salivar, subgingival e supragingival reduzidas significativamente as 12 semanas ( $P < 0,001$ ,  $P = 0,05$  e  $P < 0,001$ , respetivamente) no grupo teste quando comparado com o grupo controlo. Estes resultados coincidem com os de İnce *et al.* (2015) (Tabela 7), Tekce *et al.* (2015) e Vicario *et al.* (2013) (Tabela 8).

A avaliação do efeito de *L. reuteri* ATCU PTA 5289 nas citocinas pro-inflamatórias (TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$ , IL-17) em pacientes com periodontite crônica no ensaio de



Szkaradkiewicz, Stopa, & Karpiński (2014) (Tabela 8) mostrou haver redução significativa dos mediadores inflamatórios no grupo teste e coincidiu com a melhoria dos resultados clínicos (Tabela 9).

Tabela 9 : Resultados imunológicos do estudo de Szkaradkiewicz et al. (2014)

**Table 2** Levels of TNF- $\alpha$ , IL-1 $\beta$  and IL-17 (pg/ml) in GCF of patients in first and second term of study

Clinical indices	First term of study		Second term of study		
	Group 1 (n = 24)	Group 2 (n = 14)	Group 1 (n = 24)		Group 2 (n = 14)
			Subgroup 1A (n = 18)	Subgroup 1B (n = 6)	
TNF- $\alpha$ (pg/ml)	5.52 $\pm$ 0.94	5.42 $\pm$ 0.87	2.34 $\pm$ 0.87*	5.49 $\pm$ 0.84	5.27 $\pm$ 0.94
IL-1 $\beta$ (pg/ml)	20.74 $\pm$ 2.71	20.16 $\pm$ 2.46	6.83 $\pm$ 1.51*	19.86 $\pm$ 1.98	19.63 $\pm$ 2.21
IL-17 (pg/ml)	17.58 $\pm$ 3.23	17.23 $\pm$ 3.15	9.35 $\pm$ 1.71*	16.62 $\pm$ 2.29	15.93 $\pm$ 2.37

\* The difference between the first and the second term is statistically significant in a given group of patients

Nota: grupo 1: recebeu o probiótico – grupo 2: grupo controlo /subgrupo 1A: houve melhora significativa nos parâmetros clínicos (relacionada com a redução de TNF- $\alpha$  duas vezes e de três vezes do IL-1 $\beta$ ) – subgrupo 1B: não houve melhoria significativa dos parâmetros clínicos e os resultados são parecidos com o grupo controlo.

No seu conjunto estes ensaios clínicos sugerem que o probiótico *L. reuteri* pode servir de adjuvante eficaz ao tratamento da periodontite crónica, uma vez que traz vantagens clínicas, microbiológicas e imunológicas suplementares à terapia mecânica.

Sajedinejad *et al.* (2018) (Tabela 6) avaliaram em pacientes com periodontite crónica a administração de *L. salivarius* NK02 em bochecho por 28 dias. Em termos clínicos, a PD, o GI e o BOP foram reduzidos significativamente ( $P < 0,05$ ) ao contrário do PI em que não houve diferença significativa. As contagens de *A. actinomycetacomitans* na saliva e no GCF foram reduzidas significativamente ( $P < 0,05$ ) no GCF de *A. actinomycetacomitans* no grupo teste. Os resultados semelhantes entre os grupos em termo de PI podem provier de uma higiene oral deficiente. Contudo os autores indicaram que a qualidade da placa era diferente entre os grupos, ou seja, o grupo teste apresentou mais bactérias comensais, mas menos virulentas devido a redução de microrganismos patogénicos.

Invernici *et al.* (2018) (Tabela 6) implementaram *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* HN019 em pastilha durante 30 dias em paciente com periodontite crónica. Houve redução significativa da IL-1 $\beta$  ao fim de 30-90 dias ( $P < 0,05$ ) e da IL-8 ao fim de 30 dias ( $P < 0,05$ ) quando comparado com o grupo controlo. Em termos microbiológicos, houve uma redução mais acentuada dos periodontopatogénicos (*P. gingivalis*, *T. denticola*, *F. nucleatum vincentii*) até 90 dias no grupo teste ( $P < 0,05$ ). A estirpe colonizou

temporariamente a flora subgengival por 60 dias ( $P < 0,05$ ). Em termos clínicos, o grupo teste apresentou melhorias significativas no CAL e PD (em bolsas moderadas e profundas aos 90 dias,  $P < 0,05$ ). O grupo controlo apresentou mais locais com bolsas moderadas e profundas ( $P < 0,05$ ) aos 90 dias e revelou um risco de progressão mais elevado com necessidade de cirurgia adicional ( $P = 0,0306$ ) em mais pacientes do que no grupo teste aos 90 dias. A redução da PD foi maior com esta estirpe do que com outras bactérias (Tabela 10).

Tabela 10 : Redução da profundidade de sondagem (em mm) após 12 semanas de consumo de pastilhas probióticas, em adultos com periodontite crónica

ECR's	Estirpe(s) probiótica(s) utilizada(s)	Redução da PD (mm)
Invernici <i>et al.</i> (2018)	<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> HN019	<b>3,52</b> (em bolsas profundas)
Laleman <i>et al.</i> (2015)	<i>S. oralis</i> KJ3, <i>S. uberis</i> KJ2, <i>S. rattus</i> JH145	2,4 (em bolsas profundas)
Teughels <i>et al.</i> (2013)	<i>L. reuteri</i>	2,88 (em bolsas profundas)
İnce <i>et al.</i> (2015)	<i>L. reuteri</i>	1,7 (em bolsas profundas)
Tekce <i>et al.</i> (2015)	<i>L. reuteri</i>	1,43 (PD média)

### iii. Doenças peri-implantares

A mucosite peri-implantar é uma inflamação reversível dos tecidos moles ao redor dos implantes, sem perda óssea, provocada pelas bactérias do biofilme. É importante controlá-la porque a sua evolução conduz a peri-implantite, caracterizada por: reabsorção óssea e potencialmente perda do implante, níveis de citocinas aumentados (IL-6, IL-1 $\beta$ , IL-8) e aumento do volume do GCF (Flichy-Fernández *et al.*, 2015). O controlo mecânico do biofilme e o uso de agentes químicos (antissépticos) e antibióticos não garante a cura completa. Pensa-se que a administração de probióticos pode ajudar na formação de um novo biofilme protetor e compatível com a saúde peri-implantar (Galofré *et al.*, 2018; Peña *et al.*, 2018). Cinco ensaios clínicos randomizados relacionados com a toma de probióticos em condições de inflamação peri-implantar em adultos saudáveis foram selecionados. Os ensaios investigaram os efeitos de diferentes *Lactobacillus spp.*

Tabela 11 : Características gerais dos ECR's relacionados com a periodontologia (condições peri-implantares)

Descrição dos ECR's relacionados com a periodontologia (condições peri-implantares)					
Referência Condição oral	Parâmetros avaliados Tempos de avaliação	Desenho estudo Grupos de estudo	Tamanho amostra (no fim do estudo) Idade ou faixa-etária	Protocolo da implementação de probiótico(s): Veículo Tempo de administração	Estirpe(s) probiótica(s) utilizada(s)
<b>Peña et al., 2018</b>  <b>Mucosite peri-implantar</b>	Parâmetros clínicos (PI, BOP, PD, BOP), radiológicos (perda óssea marginal), microbiológicos (amostras placa subgingival na bolsa peri-implanta) - <i>baseline</i> , 15, 45, 135 dias	ECR paralelo, triplo-cego <i>Screening</i> (dia 0) -> 0,12% CHX durante 15 dias -> dia 45: início intervenção (30 dias) - Grupo probiótico (terapia mecânica + CHX 0,12% + probiótico) Grupo controle (terapia mecânica + CHX 0,12%)	50 pacientes saudáveis com implante com mucosite peri implantar - >18 anos	Comprimido - 1 mês (1 vez por dia)	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938 e ATCC PTA 5289
<b>Galofré et al., 2018</b>  <b>Mucosite peri-implantar e peri-implantite</b>	Parâmetros clínicos (PI, BOP, PD), microbiológicos (amostras microbiota subgingival implantes com mucosite e peri-implantite) - <i>baseline</i> , 30, 90 dias	ECR controlado prospectivo, triplo-cego - Grupo probiótico (terapia mecânica + probiótico) Grupo controle (terapia mecânica)	44 pacientes parcialmente edentulos e implantes com mucosite ou peri-implantite - Adultos	Losango - 30 dias (1 vez por dia)	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938 e ATCC PTA 5289 (1.10 <sup>8</sup> células vivas cada)
<b>Mongardini et al., 2017</b>  <b>Mucosite peri-implantar experimental</b>	Parâmetros clínicos (PI, BOP) - <i>baseline</i> , 2, 6 semanas	ECR cruzado controlado, duplo cego <i>Screening</i> -> 1 <sup>o</sup> fase indução doença (2semanas com <i>stent</i> de acrílico a usar durante a escovagem) -> 1 <sup>o</sup> fase intervenção (14 dias) -> <i>washout</i> (28dias) -> 2 <sup>o</sup> fase indução doença (14 dias) -> 2 <sup>o</sup> fase intervenção (14 dias) - Grupo probiótico e grupo placebo	19 pacientes saudáveis com implante dentário em função 1-13anos - 39-78 anos	Comprimido - 14 dias (1 vez por dia)	<i>Lactobacillus plantarum</i> , <i>Lactobacillus brevis</i>
<b>Hallström et al., 2016</b>  <b>Mucosite peri-implantar</b>	Parâmetros clínicos (PD, BOP), microbiológicos, imunológicos (citocinas IL-1 $\beta$ , IL-1RA, IL-4, IL-6, IL-8, IL-17A, CCL5, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ e GM-CSF) - <i>baseline</i> , 1,2, 4, 12, 26 semanas	ECR controlado, duplo-cego - Grupo probiótico e grupo placebo	49 pacientes com mucosite peri-implantar com um ou mais locais peri-implantar com PD=4 mm com sangramento e / ou pús ao sondar - 24-85 anos	Aplicação tópica óleo 1 vez e pastilha - 3 meses (2 vezes ao dia)	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938 e ATCC PTA 5289 (2.10 <sup>7</sup> CFU)
<b>Flichy-Fernández et al., 2015</b>  <b>Mucosite peri-implantar</b>	Parâmetros clínicos (PI, PD, mGI, PICSF), imunológicos (IL-6, IL-8, IL-1 $\beta$ ) - <i>baseline</i> , 1, 2, 8, 9, 10, 16, 17, 18 meses	ECR cruzado prospectivo controlado por placebo, duplo-cego Profilaxia (esperar 1 mês)-> intervenção (1 mês)-> profilaxia (esperar 6 meses), nova profilaxia (esperar 1 mês)-> placebo-> profilaxia (esperar 6 meses), nova profilaxia (2meses), nova profilaxia - Grupo A: sem doença peri-implantar (22 pacientes, 54 implantes) Grupo B: com mucosite peri-implantite (12 pacientes, 23 implantes)	34 pacientes saudáveis não fumadores, com pelo menos um arco dentário completamente edêntulo, com reabilitação sobre implante, prótese em função por pelo menos 24 meses - média 60 anos	Comprimido - 30 dias (1 vez por dia)	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938 (100 milhões unidades ativas) e ATCC PTA 5289 (200 milhões unidades ativas)

Peña *et al.* (2018) (Tabela 11) estudaram a adição durante 1 mês de *L. reuteri* DSM 17938 e ATCC PTA em pacientes com mucosite peri-implantar que receberam terapia mecânica e CHX 0,12% 15 dias antes o início da intervenção probiótica. Os resultados mostraram que PI (%) e BOP (%) melhoraram significativamente em ambos os grupos ( $P < 0,05$ ) sem diferença significativa entre eles ( $P > 0,05$ ) em todos os tempos da avaliação. PD (mm) só teve diferença significativa a favor do grupo controle após os 15 dias de utilização de CHX ( $P = 0,01$ ) e aos 135 dias quando comparado com os dados iniciais ( $P = 0,005$ ). Em termos microbiológicos, após a administração de *L. reuteri* não houve mudanças significativas na composição da flora bacteriana subgengival nos grupos quando comparada com os dados iniciais ( $P > 0,05$ ). *L. reuteri* não trouxe benefícios complementares à terapia mecânica.

Galofré *et al.* (2018) (Tabela 11) avaliaram também os efeitos da administração de *L. reuteri* DSM 17938 e ATCC PTA 5289 em pacientes com mucosite peri-implantar e peri-implantite durante 30 dias. Nos implantes com mucosite e com peri-implantite: o PI reduziu significativamente em ambos os grupos em comparação com a *baseline* ( $P > 0,05$ ), mas sem diferença entre eles ( $P > 0,05$ ) em todos os tempos de monitorização. BOP reduziu significativamente no grupo teste em todos os tempos avaliados quando comparado com o início da intervenção ( $P < 0,05$ ). PD reduziu significativamente no grupo teste em todos os tempos monitorizados ( $P < 0,05$ ) mas não houve diferença significativa com o placebo ( $P > 0,05$ ). Microbiologicamente, não houve alteração major na flora bacteriana subgengival ( $P > 0,05$ ). Tal como no estudo de Peña *et al.* (2018) *L. reuteri* não provocou alterações na composição da flora envolvendo os implantes analisados, mas os investigadores encontraram algumas melhorias clínicas resultantes da adição deste probiótico à terapia mecânica.

Hallström *et al.* (2016) (Tabela 11) administraram *L. reuteri* DSM 17938 e ATCC PTA 5289 em pacientes com mucosite peri-implantite durante 3 meses. Os valores de BOP e PD mais altos reduziram significativamente até 26 semanas em ambos os grupos quando comparado com a *baseline* ( $P < 0,05$ ), mas sem diferença entre eles ( $P > 0,05$ ). Em termo microbiológico, a conclusão foi a mesma do que nos ensaios de Peña *et al.* (2018) e Galofré *et al.* (2018), ou seja, não houve modificação significativa da microflora subgengival associada aos implantes com mucosite com *L. reuteri*. Em termos imunológicos, houve redução significativa ( $P < 0,05$ ) em ambos os grupos do volume do

GCF e das citocinas quando comparado com o *baseline*, mas sem diferença entre eles ( $P>0,05$ ). *L. reuteri* não proporcionou efeitos adicionais ao tratamento mecânico da mucosite peri-implantar (mesmo na presença de melhoria).

Flichy-Fernández *et al.* (2015) (Tabela 11) através de um *design* cruzado compararam a administração de *L.reuteri* DSM 17938 e ATCC PTA 5289 e placebo durante 30 dias em pacientes com saúde peri-implantar e com mucosite peri-implantar (grupo A 54 implantes e grupo B 23 implantes). Ao termo da intervenção com probiótico, um único implante desenvolveu mucosite no grupo A, e 17 dos 23 implantes no grupo B estavam livres de mucosite. Após a administração do placebo, os implantes conservaram os *scores* iniciais de mucosite no grupo A e 2 ficaram livres de mucosite no grupo B. Clinicamente, as médias dos parâmetros PI, GI, PD reduziram significativamente ( $P=0,001$ ) nos grupos probióticos quando comparado com os grupos placebo. O mesmo aconteceu com o volume do GCF ( $P<0,001$ ). No que diz respeito às citocinas a redução de IL-1 $\beta$  em ambos os grupos probióticos não foi significativa quando comparada com os grupos placebos ( $P>0,05$ ). No entanto para IL-6, no grupo probiótico B, a redução foi significativa ( $P=0,033$ ) quando comparada com o placebo B, e para IL-8 a redução em ambos os grupos probióticos foi significativa quando comparada com os placebo ( $P<0,001$  para o grupo A e  $P=0,012$  para o grupo B). De acordo com este estudo, *L. reuteri* pode ser útil em caso de mucosite peri-implantar e como medida preventiva em pacientes com saúde implantar.

O ensaio cruzado de Mongardini *et al.* (2017) (Tabela 11) avaliou os efeitos da administração durante 14 dias de *Lactobacillus plantarum* e *L. brevis* em pacientes com mucosite peri-implantar experimental. O PI foi reduzido significativamente ( $P<0,001$ ) em todos os tempos da avaliação após a implementação de probiótico sem diferença entre o grupo teste e placebo ( $P>0,05$ ). O número de locais com BOP por implante reduziu significativamente no grupo teste ( $P=0,001$ ) mas não houve diferença entre os grupos ( $P>0,05$ ) em nenhum tempo da monitorização.

Todos os ensaios que avaliaram o efeito dos probióticos na mucosite peri-implantar apresentaram boa adesão dos participantes mas, tiveram um tamanho de amostra pequeno e tempos curtos de administração o que pode explicar a ausência de resultados. Os resultados positivos obtidos no estudo de Flichy-Fernández *et al.* (2015),

estão por explicar mas podem estar relacionados com uma melhor remoção da placa subgengival antes da aplicação dos probióticos. Definitivamente, ensaios clínicos padronizados adicionais são indispensáveis para determinar e comparar a utilidade dos probióticos na prevenção, manutenção, controle e tratamento em condições gengivais, periodontais e peri-implantares para elaborar recomendações práticas e protocolos clínicos adequados (Flichy-Fernández *et al.*, 2015; Hallström *et al.*, 2013).

## **b. Influência dos probióticos no âmbito da cariologia, na constituição do microbioma e nos componentes imunológicos salivares**

### **i. Cariologia e probióticos**

A cárie dentária é uma doença multifatorial, relacionada com bactérias acidogénicas, acidúricas e tolerantes ao ácido como o *S. mutans* e alguns *Lactobacillus*. Estas bactérias produzem ácidos a partir da ingestão de carboidratos fermentáveis que desmineralizam os tecidos dentários. A prevenção da cárie passa pela administração de flúor, uso de selantes e modificação dos hábitos dietéticos (menor consumo de sacarose). O tratamento e o controlo da cárie são multimodais. A remoção mecânica da cárie deve ser combinada a um antimicrobiano para controlar a doença em crianças com risco moderado e alto (Sudhir, Praveen, Anantharaj, & Venkataraghavan, 2012). Os probióticos podem ser um complemento na prevenção de cárie dentária na medida em que podem interferir com a adesão dos microrganismos cariogénicos aos tecidos dentários, podem colonizar e perturbar o biofilme cariogénico (efeito carioestático) (Ashwin *et al.*, 2015; Campus *et al.*, 2014; Hedayati-Hajikand, Lundberg, Eldh, & Twetman, 2015b; Kuru *et al.*, 2017; Pahumunto *et al.*, 2018; Taipale, Pienihäkkinen, Alanen, Jokela, & Söderling, 2013). Sabendo que os probióticos promovem uma ação antimicrobiana pelo consumo dos nutrientes antes que os patogénicos tenham a oportunidade de usá-los, aderem aos tecidos orais, impedem a adesão/colonização/proliferação dos patogénicos e a formação de biofilme patogénico, produzem inibidores de adesão celular e antibacterianos, eles podem ser propostos como auxiliares nas estratégias de gestão da cárie (Ashwin *et al.*, 2015; Hasslöf, West, Videhult, Brandelius, & Stecksén-Blicks, 2013; Teanpaisan, Piwat, Tianviwat, Soppatha, & Kampoo, 2015).

Foram selecionados 15 ensaios clínicos para avaliar a influência de diferentes

probióticos no âmbito da cariologia em crianças e bebês, em que a susceptibilidade à cárie dentária é elevada porque o esmalte ainda não está completamente maduro quando os dentes erupcionam (Taipale *et al.*, 2013). Os investigadores consideraram mais fácil modificar o biofilme dentário imaturo das crianças através da colonização com probióticos do que o biofilme já estabelecido de adultos. Foram ainda analisados 6 ensaios em adultos para avaliar se uma integração permanente dos probióticos no biofilme maduro pode ser atingida num ambiente cariogénico.

Tabela 12 : Características gerais dos ECR's relacionados com a cariologia, a constituição do biofilme/microbiota, os parâmetros imunológicos salivares (cariologia)

Descrição dos ECR's relacionados com a cariologia, a constituição do biofilme/microbiota, os parâmetros imunológicos salivares (cariologia)					
Referência Condição oral	Parâmetros avaliados Tempos de avaliação	Desenho estudo Grupos de estudo	Tamanho amostra (no fim do estudo) Idade ou faixa-etária	Protocolo da implementação de probiótico(s): Veículo Tempo de administração	Estirpe(s) probiótica(s) utilizada(s)
<b>Pahumunto et al., 2018</b>  <b>Cárie dentária</b>	Parâmetros clínicos (cárie), microbiológicos ( <i>MS</i> e <i>LB</i> em amostras de saliva) - <i>baseline</i> , 3, 4, 6 meses	ECR controlado por placebo, duplo-cego, grupos paralelos - Grupo teste: leite com probiótico Grupo controle: leite padrão	103 crianças - 1,5-5anos	Leite 5 g com 50mL água – 3 meses (1 vez por dia)	<i>Lactobacillus paracasei</i> SD1 (10 <sup>7</sup> CFU/g)
<b>Rodriguez et al., 2016</b>  <b>Cárie dentária</b>	Parâmetros clínicos (ICDAS) - <i>baseline</i> e 10 meses	ECR controlado por placebo, triplo-cego - Grupo teste: leite com probiótico Grupo controle: leite padrão	243 crianças - 2-3anos	Leite 150mL - 10 meses (1 vez por dia) -	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> SP1 (10 <sup>7</sup> CFU/mL)
<b>Teanpaisan et al., 2015</b>  <b>Cárie dentária</b>	Parâmetros clínicos (cárie), microbiológicos ( <i>MS</i> e <i>LB</i> amostras de saliva não estimulada) e bioquímicos (pH) - <i>baseline</i> , 3, 6, 9, 12 meses	ECR controlado por placebo, duplo-cego - Grupo teste: leite com probiótico Grupo controle: leite padrão	122 crianças - 12-14 anos	Leite 5g com 50 mL água- 6 meses (1vez por dia)	<i>Lactobacillus paracasei</i> SD1 (10 <sup>7</sup> CFU/mg)
<b>Hedayati-Hajikand et al., 2015</b>  <b>Cárie dentária</b>	Parâmetros clínicos (cárie, PI, saúde gengival) - N/A	ECR controlado por placebo, duplo-cego - Grupo probiótico e grupo placebo	110 crianças - 2-3anos	Comprimido - 3 meses (1 vez por dia)	<i>Streptococcus uberis</i> KJ2TM, <i>Streptococcus oralis</i> KJ3TM, <i>Streptococcus rattus</i> JH145TM (10 <sup>8</sup> CFU)
<b>Stensson et al., 2014</b>  <b>Cárie dentária</b>	Parâmetros clínicos (cárie, PI, GI), microbiológicos ( <i>MS</i> e <i>LB</i> , amostras de placa e saliva), imunológicos (sIgA) - <i>baseline</i> e aos 9 anos de idade	ECR controlado por placebo, simples cego - Grupo teste: óleo contendo probiótico vivo derivado do leite materno Grupo placebo	113 bebês (e mães respetivas) - 9 anos (NA)	Gotas - 4 semanas antes o parto até 1 ano de idade (5 gotas por dia)	<i>Lactobacillus reuteri</i> (10 <sup>8</sup> CFU)
<b>Taipale et al., 2013</b>  <b>Cárie dentária</b>	Parâmetros clínicos (ICDAS, PI), microbiológicos ( <i>MS</i> amostras placa) - 1, 8, 24 meses de idade e 4 anos de idade	ECR - Grupo probiótico + xilitol 100-300mg Grupo xilitol (100-300mg) Grupo sorbitol (100-300mg)	106 crianças - 1-2meses	Libertação lenta ou comprimido - A partir de 1-2meses de idade até 2 anos (2 vezes por dia)	<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> BB-12 (5.10 <sup>9</sup> CFU)
<b>Hasslöf et al., 2013</b>  <b>Cárie dentária</b>	Parâmetros clínicos (cárie), microbiológicos ( <i>MS</i> e <i>LB</i> em amostras de saliva, colonização pelo probiótico) - 3, 6 e 9 anos de idade	ECR controlado por placebo, duplo-cego - Grupo probiótico e grupo placebo	118 bebês - 4 meses	Cereais suplementadas - 9 meses (1 vez por dia)	<i>Lactobacillus paracasei</i> F19 (10 <sup>8</sup> CFU)



Tabela 13 : Características gerais dos ECR's relacionados com a cariologia, a constituição do biofilme/microbiota, os parâmetros imunológicos salivares (cariologia)

Descrição dos ECR's relacionados com a cariologia, a constituição do biofilme/microbiota, os parâmetros imunológicos salivares (cariologia)					
Referência Condição oral	Parâmetros avaliados Tempos de avaliação	Desenho estudo Grupos de estudo	Tamanho amostra (no fim do estudo) Idade ou faixa-etária	Protocolo da implementação de probiótico(s): Veículo Tempo de administração	Estirpe(s) probiótica(s) utilizada(s)
Villavicencio <i>et al.</i> , 2018  Microflora cariogénica Salivar, pH salivar	Parâmetros clínicos (ICDAS, PI), microbiológicos (MS, LB), bioquímicos (pH, capacidade tampão) - baseline, 9 meses	ECR controlado por placebo, triplo-cego - Grupo probiótico: leite probiótico Grupo controle (leite parão)	321 crianças - 3-4anos	Leite 200mL - 9 meses (1 vez por dia durante 5 dias por semana)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> (5.10 <sup>6</sup> CFU/g) e <i>Bifidobacterium longum</i> (3.10 <sup>6</sup> CFU/g)
Alamoudi <i>et al.</i> , 2018  Microflora cariogénica Salivar, pH salivar	Parâmetros microbiológicos (LB, MS), clínicos (PI), bioquímicos (pH salivar, capacidade tampão) - baseline, 28 dias	ECR controlado, duplo-cego - Grupo probiótico e grupo controle	178 crianças - 3-6anos	Pastilha - 28 dias (2 vezes por dia)	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938 e ATCC PTA 5289
Bafna <i>et al.</i> , 2018  Microflora cariogénica salivar	Parâmetros microbiológicos (LB, MS salivares) - baseline, 2 e 4 semanas	ECR controlado, duplo-cego - Grupo probiótico e grupo controle	70 adultos com alto risco de cárie e com contagem de MS salivares >106 CFU/mL - >18anos	Iogurte 100g - 2 semanas (1 vez por dia)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA5 e <i>Bifidobacterium lactis</i> BB12
Nagarajappa <i>et al.</i> , 2015  Microflora cariogénica salivar	Parâmetros microbiológicos (LB e MS salivares) - baseline, 1h, 18 dias	ECR controlado, duplo-cego - Grupo probiótico e grupo controle	30 adultos - 18-22 anos	Gelado 42g para 60mL - 18 dias (1 vez por dia)	<i>Bifidobacterium infantis</i> 35624 (10 <sup>6</sup> CFU/mL)
Ashwin <i>et al.</i> , 2015  Microflora cariogénica salivar	Parâmetros microbiológicos (MS salivares) - baseline, 7, 30 dias, 6meses	ECR controlado por placebo, duplo-cego - Grupo probiótico e grupo placebo	60 crianças com CPOD de 0 - 6-12anos	Gelado 54g - 7 dias (1 vez por dia)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA5 e <i>Bifidobacterium lactis</i> BB12 (10 <sup>6</sup> CFU cada)
Nozari <i>et al.</i> , 2015  Microflora cariogénica salivar	Parâmetros microbiológicos (LB e MS salivares) - N/A	ECR controlado por placebo, duplo-cego, paralelo 4 períodos: 1º e 3º: washout de 1-2 semanas respetivamente; 2º e 4º: intervenção 2semanas - Grupo teste: iogurte probiótico Grupo controle: iogurte placebo	49 crianças - 6-12 anos	Iogurte 200g - 2 semanas (1 vez por dia)	<i>Bifidobacterium lactis</i> (10 <sup>6</sup> CFU/g)

Tabela 14 : Características gerais dos ECR's relacionados com a cariologia, a constituição do biofilme/microbiota, os parâmetros imunológicos salivares (cariologia)

Descrição dos ECR's relacionados com a cariologia, a constituição do biofilme/microbiota, os parâmetros imunológicos salivares (cariologia)					
Referência Condição oral	Parâmetros avaliados Tempos de avaliação	Desenho estudo Grupos de estudo	Tamanho amostra (no fim do estudo) Idade ou faixa-etária	Protocolo da implementação de probiótico(s): Veículo Tempo de administração	Estirpe(s) probiótica(s) utilizada(s)
Javid <i>et al.</i> , 2015  Microflora cariogénica salivar	Parâmetros microbiológicos (LB e MS salivares) - baseline, 2semanas	ECR, simples cego - Grupo probiótico Grupo controlo (iogurte 300g/d)	66 adultos com estágio inicial de cárie - 18-30anos	Iogurte 300g/d - 2 semanas (2 vezes ao dia)	<i>Bifidobacterium lactis</i> (10 <sup>6</sup> CFU/mL)
Bhalla <i>et al.</i> , 2015  Níveis de <i>Streptococcus</i> <i>mutans</i>	Parâmetros microbiológicos (MS salivares) - baseline, 1h, 7 dias	ECR, controlado - Grupo probiótico Grupo controlo (colhada de requeijão)	30 crianças livres de cárie - 12-14anos	Coalhada de requeijão 200g - 7 dias (1 vez por dia)	<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> BB-12
Teanpaisan & Piwat 2014  Níveis de <i>Streptococcus</i> <i>mutans</i>	Parâmetros microbiológicos (LB e MS, leveduras salivares) Colonização pelo probiótico (PCR) - baseline, 1, 2, 3, 4, 8 semanas	ECR prospetivo, controlado por placebo, duplo-cego - Grupo A: probiótico Grupo B: placebo (leite pó padrão)	37 adultos com cárie em menos de 2 dentes, ausência de lesões cariosas ativas não tratadas e ausência de gengivite ou doença periodontal - 18-25anos	Leite em pó 10g com 50mL água - 4 semanas (1 vez por dia)	<i>Lactobacillus paracasei</i> SD1
Campus <i>et al.</i> , 2014  Microflora cariogénica, pH salivar, saúde gengival	Parâmetros microbiológicos (MS, bioquímicos (pH salivar não mostrado), clínicos (BOP) - baseline, 3, 6, 8 semanas	ECR controlado por placebo, duplo-cego - Grupos probiótico e placebo	181 crianças com 2 a 3 lesões cariosas e concentração salivar de MS ≥ 105 CFU/mL - 6-8anos	Pastilha - 6 semanas (2 vezes por dia)	<i>Lactobacillus brevis</i> CD2
Mortazavi & Akhlaghi 2012  Microflora cariogénica salivar	Parâmetros microbiológicos (LB e MS salivares) - baseline, 2 semanas	ECR - Grupos probiótico e placebo	60 adultos saudáveis com lesões cariosas ativas não tratadas e sinais de gengivite ou doença periodontal - 18-37 anos	Queijo branco 50g- 2 semanas (2 vezes por dia)	<i>Lactobacillus casei</i> LAFTI L26 (10 <sup>6</sup> CFU/g)
Cildir <i>et al.</i> , 2012  Microflora cariogénica salivar em crianças operadas de fenda palatina	Parâmetros microbiológicos (LB e MS salivares com teste CRT) - baseline, 25 dias	ECR, cruzado, duplo-cego 4 períodos: - 2º e 4º de 25 dias cada uma (intervenção) - 1º e 3º washout de 1 e 3semanas respetivamente - Grupos probiótico e placebo	19 crianças operadas de fissura labiopalatina sem lesões de cárie não tratada - 4-12 anos	Gota - 25 dias (5 gotas por dia)	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938 e ATCC PTA 5289 (1,3.10 <sup>8</sup> CFU/5gotas)
Sudhir <i>et al.</i> , 2012  Níveis de <i>Streptococcus</i> <i>mutans</i> e pH salivar	Parâmetros microbiológicos (MS salivares) e bioquímicos (pH salivar) - baseline, 30 dias	ECR - Grupo probiótico (requeijão com probiótico) Grupo placebo (requeijão 200mL)	40 crianças livres de cárie - 10-12anos	Requeijão 200mL - 30 dias (1 vez por dia)	<i>Lactobacillus acidophilus</i>

Rodríguez *et al.* (2016) (Tabela 12) avaliaram a influência da estirpe *L. rhamnosus* SP1. Observaram que após 10 meses de administração sob a forma de leite em crianças, a prevalência da cárie no grupo probiótico foi menor (54,5% das crianças no grupo probiótico vs. 65,8% no placebo), tal como a incidência de lesões cavitadas (9,7% das crianças do grupo probiótico vs. 24,3% do placebo). O aumento de novas lesões foi significativo no grupo placebo (aumento de 1,08 $\pm$ 1,17 por crianças vs. 0,58 $\pm$ 1,7 com o probiótico,  $P<0,001$ ).

Hasslöf *et al.* (2013) (Tabela 12) estudaram o *Lactobacillus paracasei* F19 administrado em suplemento dietético durante 9 meses. Concluíram não haver mudanças significativas entre os grupos ( $P>0,05$ ) (nem na contagem de *Lactobacillus spp.* e *S. mutans*, nem na experiência de cárie aos 3 e 6 e 9 anos de idade (Figura 6)). Além disso, o probiótico não colonizou permanentemente a flora oral embora fosse ingerido precocemente. *S. mutans* (CFU/mL) foi correlacionado com a cárie aos 9 anos só no grupo placebo ( $P<0,01$ ).

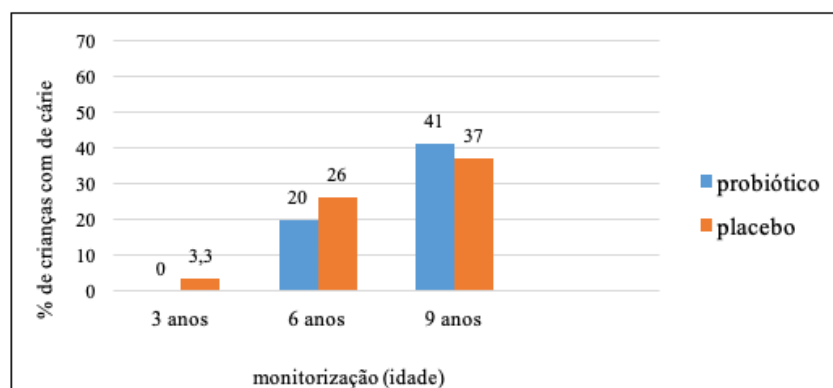


Figura 6 : Ocorrência de cárie em crianças após suplementação de *L. paracasei* F19 durante 9 meses a partir de 4 meses de idade-[Hasslöf et al. (2013)]

Taipale *et al.* (2013) (Tabela 12) estudaram o *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12 administrado por liberação lenta ou comprimido desde 1 meses de idade até aos 2 anos de idade, e, compararam com o uso de xilitol e de sorbitol. O *B. animalis subsp. lactis* BB-12 não afetou significativamente a ocorrência da cárie em crianças com baixo risco de cárie até aos 4 anos quando comparado com os grupos xilitol e sorbitol ( $P>0,05$ ). A colonização por *S. mutans* foi maior aos 4 anos do que aos 2 anos em todos os grupos (grupo BB-12 56% vs. 6%, grupo xilitol: 31% vs. 70%, grupo sorbitol: 46% vs.

10%), sem diferença entre eles ( $P=0,180$ ). Os autores correlacionaram a ocorrência da cárie com a acumulação de placa e com a presença de *S. mutans* ( $P=0,002$ ).

Hedayati-Hajikand *et al.* (2015b) (Tabela 12), após administração de comprimidos contendo *Streptococcus uberis* KJ2TM, *Streptococcus oralis* KJ3TM e *Streptococcus rattus* JH145TM em crianças por 3 meses, observaram redução significativa ( $P<0,05$ ) da cárie dentária ao fim de um ano com uma prevenção de 75% das desmineralizações do esmalte. Os PI (29% vs. 25%) e BOP (13% vs. 10%) não foram significativamente diferentes entre os grupos tal como a gravidade das lesões. Nenhuma criança teve cárie durante o estudo. Os pais tiveram que esmagar os comprimidos, o que pode indicar que o comprimido não é o veículo adequado para crianças (Hedayati-Hajikand *et al.*, 2015b).

O ensaio clínico de Pahumunto *et al.* (2018) (Tabela 12) mostrou redução significativa do risco de cárie e de *S. mutans* em crianças com alto nível no grupo teste ( $P=0,016$ ) após o consumo por 3 meses de leite contendo *L. paracasei* SD1. As lesões cáries ativas tornaram-se inativas para 3,06% (% de superfície dentária) no grupo teste vs. 1,53% no grupo controlo e as inativas tornaram-se ativas para 4,44% no grupo teste vs. 4,88% no grupo controlo. O aumento de cárie foi significativo no grupo controlo quando comparado com o grupo teste ( $P=0,029$ ). Ademais, houve uma correlação negativa entre a progressão da cárie e a ingestão do *L. paracasei* SD1: menor risco de progressão de cárie no grupo probiótico após a intervenção do que no início do estudo em que o risco era maior em crianças com alto risco de cárie ( $P<0,05$ ). O veículo de administração foi bem aceite pelas crianças. A colonização por *Lactobacillus spp.* não foi significativa durante o estudo ( $P>0,05$ ).

Teanpaisan *et al.* (2015) (Tabela 12) estudaram também o consumo de leite contendo *L. paracasei* SD1, por 6 meses em crianças. Houve uma redução da contagem de *S. mutans* e redução do risco de cárie em crianças de alto risco no grupo probiótico (4,5 vezes menos do que nas crianças com baixo risco,  $P=0,019$ ). Os níveis de *S. mutans* salivares reduziram-se significativamente aos 3 meses ( $P<0,001$ ) e 6 meses ( $P=0,001$ ) no grupo probiótico quando comparado com o placebo. Aos 12 meses, não houve diferença com o *baseline* no nível de *S. mutans* no grupo probiótico ( $P>0,05$ ). Os níveis de *Lactobacillus spp.* salivares aumentaram significativamente nos grupos ao longo do

período do estudo ( $P<0,05$ ), mais no grupo probiótico ( $P<0,001$ ). Este último ponto sugeriu uma ingestão de probióticos provenientes de diversas fontes (legumes, fruta em conserva) pelos participantes do grupo controlo o que foi confirmado pela análise ADN uma vez que os perfis de *L. paracasei* foram diferentes. A colonização pelo probiótico diminui com o tempo: 85%-80%-60%-0% nos 3-6-9-12 meses respetivamente. Esses resultados indicam que esta estirpe colonizou mais 3 meses após a cessação do probiótico e precisou de 9 meses após a descontinuação para não ser detetável. Em relação ao pH (neutra), não houve diferença entre os grupos.

Embora num tempo de estudo curto, a ingestão quotidiana de *L. paracasei* SD1 parece influenciar benéficamente o risco de cárie precoce e a contagem dos agentes cariogénicos, segundo os resultados dos ensaios de Teanpaisan *et al.* (2015) e Pahumunto *et al.* (2018). No estudo de Teanpaisan *et al.* (2015), a colonização pelo probiótico manteve-se durante mais tempo, talvez devido a uma exposição mais prolongada (6 meses vs. 3 meses no estudo de Pahumunto *et al.* (2018)).

Stensson *et al.* (2014) (Tabela 12) utilizaram o *L. reuteri*, administrado em gotas em grávidas (a partir do 9<sup>a</sup> mês de gravidez) e nos bebés respetivos (até 1 ano de idade). Aos 9 anos de idade, houve melhorias do GI ( $P=0,005$ ) e da prevalência de cárie no grupo teste [ $0.67 \pm 1.61$  vs.  $1.53 \pm 2.64$  ( $P<0,05$ ) com 82% das crianças livres de cárie vs. 58% no placebo,  $P<0,001$ ]. Não houve diferença na contagem salivar (CFU/mL) e na placa (%) de *S. mutans* e *Lactobacillus spp.* ( $P>0,05$ ), nem na acumulação de placa ( $P=0,29$ ) ou nos valores de sIgA (mg/L) ( $P=0,08$ ). O *L. reuteri* foi detetado em duas crianças de cada grupo. Os fatores influenciadores (dieta, higiene oral, suplementação com flúor e fatores socioeconómicos) não mostraram diferenças entre os grupos no início, mas não foram estudados aos 9 anos de idade o que é uma limitação importante do estudo porque estes fatores dificultam a interpretação do benefício real dos probióticos no desenvolvimento da cárie.

Campus *et al.* (2014) (Tabela 14) estudaram os efeitos da administração de *L. brevis* CD2 em pastilha por 6 semanas em crianças. O probiótico participou na redução significativa da contagem média ( $\log_{10}$  CFU/mL) de *S. mutans* salivares no grupo teste após 3 ( $P=0,04$ ) e 6 semanas de intervenção ( $5,4 \pm 0,3$  para  $4,9 \pm 0,1$ ,  $P=0,01$ ). O grupo placebo teve uma contagem que permaneceu estável ao longo do estudo. O *L. brevis* CD2

participou igualmente na redução significativa do sangramento gengival após 6 semanas ( $P=0,02$ ). A diferença foi também significativa 2 semanas após a descontinuação (24,4% no grupo teste vs. 28,6% no grupo placebo,  $P=0,03$ ) provavelmente devido a uma produção de arginina desaminase pelo *L. brevis* CD2 que favoreceu a redução de mediadores inflamatórios (exs. NO, PGE2 e MMPs). Relativamente à acidogenicidade da placa, o *L. brevis* CD2 provocou uma redução significativa do pH ( $P<0,05$ ).

Bhalla *et al.* (2015) (Tabela 14) avaliaram o *Bifidobacterium animalis subsp. lactis* BB-12 administrado em coalhada em crianças. Uma redução significativa da contagem de *S. mutans* ocorreu após 1h de ingestão e após 7 dias de intervenção ( $P<0,05$ ) (Figura 7).

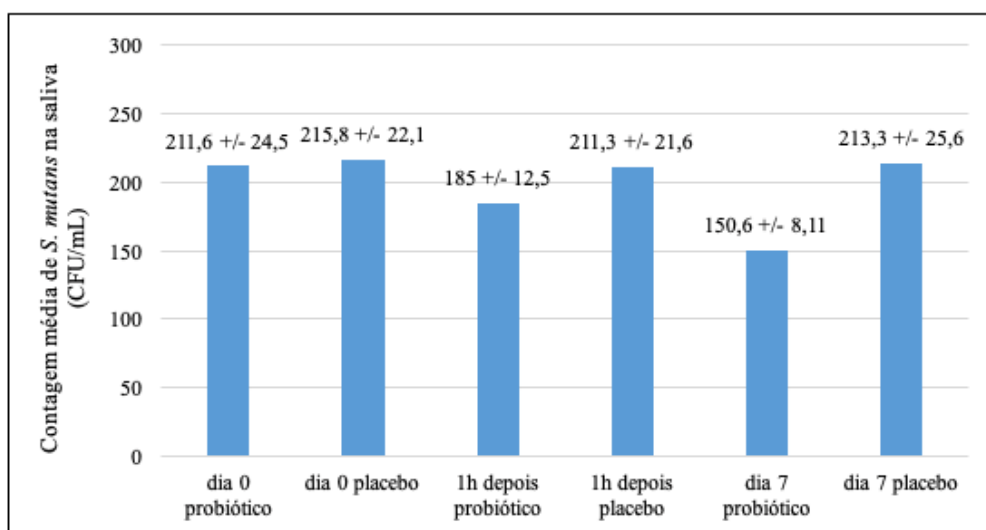


Figura 7 : Contagem de *S. mutans* (CFU/mL) salivar antes e depois a ingestão de BB-12-[Bhalla et al. (2015)]

No ensaio de Sudhir *et al.* (2012) (Tabela 14), o *L. acidophilus* administrado em crianças durante 30 dias permitiu a redução significativa da contagem de *S. mutans* no grupo teste ( $P<0,001$ ). O pH baixou sem diferença entre os grupos ( $P=0,386$ ), mas ficou acima do pH crítico (6,72+/-0,32 no grupo probiótico e 6,63+/-0,37 no placebo), evitando um efeito nefasto sobre as condições orais.

Ashwin *et al.* (2015) (Tabela 13) após a ingestão durante 7 dias de uma combinação probiótica (*L. acidophilus* LA5 e *B. lactis* BB12) em crianças observaram uma redução significativa de *S. mutans* no grupo teste ( $P<0,001$ ) tal como no *follow-up* de 30 dias ( $P<0,001$ ). Após 6 meses de descontinuação, os valores de *S. mutans*

voltaram aos valores iniciais ( $P=0,584$ ). Isto significa que o efeito sinérgico desta combinação probiótica diminuiu ao longo do tempo e que a colonização foi temporária. O grupo controlo teve um aumento constante e não significativo da contagem de *S. mutans* ( $P>0,05$ ).

Alamoudi, Almagbadi, El Ashiry, & El Derwi (2018) (Tabela 13) observaram uma redução significativa da contagem de *S. mutans* ( $P=0,00$ ) e de *Lactobacillus spp.* ( $P=0,02$ ) no grupo teste após consumo de pastilhas com *L. reuteri* DSM 17938 e ATCC PTA 5289 durante 28 dias em crianças. Não houve diferença entre os grupos nos valores de PI ( $P=0,451$ ) e melhoria na capacidade tampão ( $P=0,577$ ). Os resultados obtidos de PI e capacidade tampão não estão unicamente associados ao consumo do probiótico, vários outros fatores poder ter exercido uma influência no biofilme e nos microrganismos orais, que podem contribuir para estes resultados (exs. uso de pasta com flúor, modificação dos hábitos de dieta, higiene oral, efeito Hawthorne).

Villavicencio, Villegas, Arango, Arias, & Triana (2018) (Tabela 13) não mostraram diferença significativa na redução da contagem de *S. mutans* entre o grupo teste e grupo controlo após administração de *L. rhamnosus* e *Bifidobacterium longum* em leite em 321 crianças durante 9 meses ( $P=0,173$ ), nem na prevalência da cárie ( $P=0,767$ ), no pH e na acumulação de placa ( $P>0,05$ ). Houve diferença na capacidade tampão entre o início e fim da intervenção em ambos os grupos ( $P<0,001$ ) por causa dos componentes do leite e não especificamente devido ao probiótico em si.

No ensaio de Nozari *et al.* (2015) (Tabela 13) em que as crianças ingeriram iogurte com *Bifidobacterium lactis* durante duas semanas, observou-se que o grupo controlo que ingeriu o iogurte natural revelou redução significativa de *S. mutans* ( $P=0,003$ ) ao contrário do grupo teste em que nem *S. mutans* nem *Lactobacillus spp.* foram reduzidos significativamente ( $P>0,05$ ). Estes resultados podem ser explicados pelo facto de que as bactérias contidas no iogurte natural podem ser mais parecidas com as bactérias orais e competir melhor com as bactérias cariogénicas do que o próprio probiótico *B. lactis*.

Cildir *et al.* (2012) (Tabela 14) avaliaram o efeito da administração de *L. reuteri* em gotas durante 25 dias sobre os níveis de *Lactobacillus spp.* e *S. mutans* em crianças com fissura palatina (população de risco com maior retenção dos alimentos, maiores

níveis de cáries e de bactérias cariogénicas do que crianças saudáveis). Não foi encontrada uma redução significativa nos níveis de *S. mutans* e *Lactobacillus spp.* salivares no grupo probiótico ( $P>0,05$ ), nem diferença entre os grupos ( $P>0,05$ ). Estes resultados podem dever-se ao veículo escolhido, talvez inadequado para equilibrar a flora oral nestas crianças, ao tempo de contato insuficiente e a um período de avaliação muito curto (25 dias apenas) para detetar qualquer mudança.

Bafna *et al.* (2018) (Tabela 13) utilizaram iogurte com *L. acidophilus* LA5 e *Bifidobacterium lactis* BB12 durante 2 semanas para avaliar o impacto sobre a contagem salivar de bactérias cariogénicas em adultos. Houve uma redução temporária significativa da contagem de *S. mutans* no grupo teste após 2 semanas de consumo ( $P<0,001$ ). Existe um efeito tempo-intervenção ( $P<0,001$ ) na medida em que a redução significativa de *S. mutans* no grupo probiótico foi notada na 1ª monitorização (ao fim de 2 semanas de ingestão,  $P<0,001$ ) e já não na 2ª monitorização (2 semanas após a descontinuação,  $P=0,84$ ).

(Mortazavi & Akhlaghi (2012) (Tabela 14) apresentaram redução significativa na contagem de *S. mutans* salivares em adultos que consumiram queijo branco com *L. casei* LAFTI L26 durante 2 semanas ( $P=0,001$ ). Esta redução foi temporária, 2 semanas após descontinuação já não havia diferença significativa entre os grupos ( $P=0,46$ ). Em relação à redução da contagem de *Lactobacillus spp.*, não houve diferença significativa entre os grupos ( $P=0,12$ ). O *L. casei* LAFTI L26 reduziu as contagens de *S. mutans* nos pacientes com os níveis mais elevados ( $>10^5$ CFU/mL) (OR=11,6, IC95%[1,5;86,1],  $P=0,017$ ).

Javid *et al.* (2015) (Tabela 14) avaliaram o efeito em adultos da ingestão de iogurte com *B. lactis* sobre a microflora cariogénica salivar. As contagens de *S. mutans* ( $P<0,001$ ) e *Lactobacillus spp.* ( $P=0,594$ ) reduziram no grupo teste quando comparado com o grupo controlo após 2 semanas de intervenção (Figura 8).



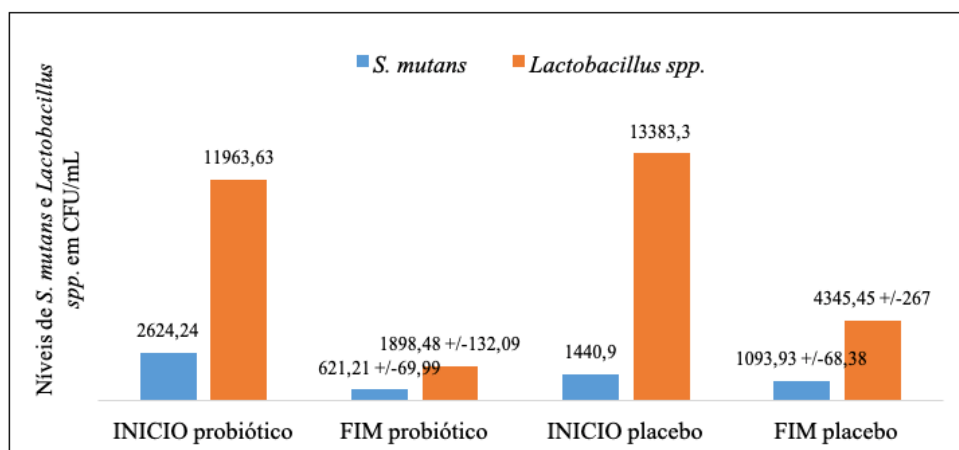


Figura 8 : Avaliação dos níveis de *S. mutans* e *Lactobacillus spp.* (em CFU/mL de saliva) após o consumo de *B. lactis*-[Javid *et al.* (2015)]

No estudo de Teanpaisan & Piwat (2014) (Tabela 14) a administração em adultos por 4 semanas de *L. paracasei* SD1 em leite permitiu uma redução significativa de *S. mutans* no grupo teste ( $P < 0,001$ ) em todos os tempos de monitorização. A contagem de *Lactobacillus spp.* aumentou significativamente neste grupo quando comparado com o grupo controlo ( $P < 0,001$ ), a diferença foi significativa quando comparada com a contagem inicial após 4 semanas ( $P < 0,05$ ) sugerindo uma colonização temporária pelo probiótico (detetado em 75% das pessoas do grupo teste e nenhuma do grupo controlo às 4 semanas). Contudo, houve um aumento significativo de *Lactobacillus spp.* na segunda semana de consumo no grupo controlo ( $P < 0,05$ ) quando comparado com o início talvez devido a uma fonte externa possível. Não houve efeito sobre a contagem de levedura que tenderam a diminuir no grupo teste e aumentar no grupo controlo, nem diferença significativa entre eles ( $P > 0,05$ ).

Nagarajappa *et al.* (2015) (Tabela 13) após ingestão de gelado com *B. infantis* por 28 dias em adultos, observaram uma redução da contagem de *S. mutans* ( $P < 0,05$ ) quando comparado com o início e com o grupo controlo ( $P < 0,05$ ). *B. infantis* não influenciou os níveis de *Lactobacillus spp.* ( $P > 0,05$ ).

*L. acidophilus*, *L. reuteri*, *B. lactis* e *L. paracasei* podem ser eficazes como auxiliar ao tratamento restaurador em crianças com qualquer risco de cárie, ou, quando usados em conjunto com modificação dos hábitos dietéticos (Sudhir *et al.*, 2012). Segundo os ensaios de Villavicencio, Villegas, Arango, Arias, & Triana (2018), Bhalla *et al.* (2015), Pahumunto *et al.* (2018), Sudhir *et al.* (2012) e Teanpaisan *et al.* (2015), os

produtos lácteos (iogurte, leite) parecem ser os veículos favoritos para o consumo de probióticos orais em crianças. Para além de serem fáceis de ingerir, contêm nutrientes essenciais: cálcio, fosforo, vitamina, proteína, fosfopéptidos de caseína que promovem a remineralização do esmalte, neutralizam ácidos, participam no tamponamento e interferem com a acidez dos próprios probióticos *Lactobacillus spp.* ou *Bifidobacterium spp.* A mistura de probiótico(s) com produtos lácteos desencadeia um efeito sinérgico (Bafna *et al.*, 2018). A heterogeneidade dos ensaios (variabilidade no desenho de estudo, intervalo de administração, estirpes utilizadas, dosagem, veículo e as características individuais foram dissemelhantes) explica as variações nos resultados e dificulta as eventuais comparações. É preciso incluir mais pessoas nos estudos para tornar mais forte a evidência estatística. Contudo, globalmente, estes estudos sugerem que o consumo a curto prazo de probióticos pode reduzir as contagens de bactérias cariogénicas, prevenindo a formação de placa e controlar assim a progressão da cárie dentária. Contudo, os probióticos não eliminam definitivamente os patogénicos e uma redução na contagem salivar não é sinónimo de redução da virulência da placa bacteriana (M. K. Keller, Hasslöf, Dahlén, Stecksén-Blicks, & Twetman, 2012). Estes estudos sugerem também que os probióticos são capazes de colonizar temporariamente o ecossistema oral ocupando os sítios ocupados normalmente pelos agentes patogénicos (Bafna *et al.*, 2018). Os estudos de curto prazo apresentados mostram só efeitos temporários da utilização de probióticos pois após descontinuação, os níveis bacterianos voltam apressadamente às contagens iniciais. Mais ensaios clínicos de longo prazo devem ser elaborados para estabelecer a relação dose-resposta mais benéfica e avaliar a persistência dos probióticos. Além disso, os futuros ensaios devem não só avaliar a contagem de bactérias cariogénicas mas igualmente a progressão/incidência da cárie porque como já foi referido, virulência e contagem não são sinónimos (Campus *et al.*, 2014; Pahumunto *et al.*, 2018; Teanpaisan *et al.*, 2015). Os estudos revelam que os efeitos são estirpes-dependentes e, que os probióticos são bem aceites pelos participantes (elvadas taxas de adesão), contudo podem não ser universalmente eficazes para prevenir a cárie dentária. Uma vez que os estudos são realizados em condições reais, há fatores externos (hábitos alimentares, fonte externa de probióticos, pasta dentífrica fluoretada) que podem impedir a observação de todos os benefícios dos probióticos (Alamoudi *et al.*, 2018; Ashwin *et al.*, 2015; Bafna *et al.*, 2018; Teanpaisan *et al.*, 2015).

Em termos de saúde pública, a questão económica com a redução do custo da terapia convencional pelo uso de probióticos na saúde oral deve ser mais estudada (custo-

efetividade/benefício). Assume-se que o consumo diário é necessário para garantir os efeitos e que os probióticos podem ser facilmente integrados nas refeições (Bhalla *et al.*, 2015; Hedayati-Hajikand *et al.*, 2015b; Rodríguez *et al.*, 2016; Villavicencio *et al.*, 2018).

## ii. Probióticos e microbiota oral

A comunidade de microrganismos que coloniza a boca desempenha principalmente uma função protetora contra os agentes patogênicos. As interações dessa comunidade com o ambiente e a presença de nutrientes permitem um crescimento bacteriano harmonioso (Romani Vestman, Chen, Lif Holgerson, Öhman, & Johansson, 2015). A placa dentária é composta por células bacterianas (principalmente estreptococos e lactobacilos), polímeros/proteínas salivares, metabolitos/produtos/toxinas extracelulares bacterianos e restos alimentares. A acidogenicidade da placa dentária é influenciada pelo tipo de açúcar disponível e tipo de bactérias presentes. De ponto de vista dentário, os lactobacilos são potencialmente cariogênicos devido às propriedades acidúricas e acidogênicas. Contudo, os lactobacilos probióticos devido a produção de ácidos podem reduzir e até inibir o crescimento de *S. mutans* sem afetar a flora comensal, e inibir a adesão de outros microrganismos patogênicos, reduzindo a quantidade de biofilme formado (Romani Vestman *et al.*, 2015) (Mette K. Keller & Twetman, 2012; Marttinen *et al.*, 2012). Os probióticos são acidogênicos e acidúricos, e podem por isso potencializar a acidogenicidade da placa e aumentar a carga de microrganismos patogênicos tornando o biofilme dentário mais patogênico (Marttinen *et al.*, 2012). Os 9 ensaios a seguir tentaram verificar se a administração de probióticos prejudica ou não o ecossistema oral.

Tabela 15 : Características gerais dos ECR's relacionados com a cariologia, a constituição do biofilme/microbiota, os parâmetros imunológicos salivares (microbiota oral e parâmetros imunológicos salivares)

Descrição dos ECR's relacionados com a cariologia, a constituição do biofilme/microbiota, os parâmetros imunológicos salivares (microbiota oral)					
Referência Condição oral	Parâmetros avaliados Tempos de avaliação	Desenho estudo Grupos de estudo	Tamanho amostra (no fim do estudo) Idade ou faixa-etária	Protocolo da implementação de probiótico(s): Veículo Tempo de administração	Estirpe(s) probiótica(s) utilizada(s)
Sarmiento <i>et al.</i> , 2019  Microbiota oral	Parâmetros microbiológicos (amostras de saliva), Colonização probiótico - baseline, 7, 11, 14, 21, 26 e 28 dias	ECR controlado - Grupo probiótico Grupo placebo (Petit-suisse)	39 crianças - 10-12 anos	Petit-suisse 50g - 2 semanas (1 vez por dia, de segunda até sexta na 1ª semana e segunda até quinta na 2ª semana)	<i>Lactobacillus casei</i>
Rungsri <i>et al.</i> , 2017  Microbiota oral	Parâmetros microbiológicos (MS, LB salivares), clínicos (DMFT, PI, GI), bioquímicos (pH salivar) - baseline, 4 (só parâmetros microbiológicos) e 8 semanas	ECR prospetivo, controlado, duplo-cego - Grupo teste ( <i>L. rhamnosus</i> SD11) Grupo controlo controlo ( <i>L. bulgaricus</i> )	43 adultos com cáries em ≤2 dentes, ausência de doença periodontal - 20-25anos	Leite 100mL - 4 semanas (1 vez por dia)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> SD11 ou <i>Lactobacillus bulgaricus</i> (controlo)
Romani Vestman <i>et al.</i> , 2015  Microbiota oral	Parâmetros microbiológicos (amostras de saliva e biofilme para composição microbiota; pirosequenciação, cultura, PCR) - baseline, 4, 8, 12 semanas, 1 e 6 meses	ECR, controlado por placebo, duplo-cego - Grupo teste (probiótico, isomalte, óleo de palma hidrogenado, aromatizante de menta e pimenta, óleo de hortelã-pimenta e sucralose) Grupo controlo	44 adultos livres de cárie ou doença periodontal - 20-66anos	Pastilha - 12 semanas (2 vezes por dia)	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938 e ATCC PTA 5289 (10 <sup>8</sup> CFU cada)
Toivainen <i>et al.</i> , 2015  Microbiota oral	Parâmetros clínicos (PI, GI), microbiológicos (MS, LB) - baseline, 4 semanas	ECR controlado, duplo-cego - Grupo probiótico e grupo placebo	62 adultos com contagens de MS salivar ≥103 CFU/ mL - média 24anos	Pastilha - 4 semanas (4 vezes por dia)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> e <i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> BB-12 (2.10 <sup>9</sup> células cada)
Burton <i>et al.</i> , 2013  Microbiota oral	Parâmetros clínicos (PI, GI), microbiológicos - 1, 2, 3, 7 meses	ECR controlado, duplo-cego - Grupo probiótico e grupo placebo	83 crianças com experiência de cárie (pelo menos 3 restaurações, 1 colocada nos últimos 12meses), sem deteção de <i>S. salivarius</i> produtor de BLIS; 10 <sup>4</sup> CFU/ml de MS - 5-10anos	Pastilha - 3 meses (2 vezes por dia)	<i>Streptococcus salivarius</i> M18
Thakkar, 2013  Biofilme dentário	Parâmetros clínicos (PI) - baseline, 15dias, 3 semanas depois	ECR controlado - Grupo placebo (água destilada colorida) Grupo CHX 0,12% Grupo probiótico (Darolac)	90 crianças sem cárie ativa, escore placa leve a moderado - 13-15 anos	Bochecho (1g com 10mL água) - 14 dias (1 vez por dia)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> , <i>Lactobacillus</i> <i>rhamnosus</i> , <i>Bifidobacterium longum</i> , <i>Saccharomyces boulardii</i> (1,25 mil milhões)
Keller & Twetman 2012  Microbiota oral e produção de ácido lático	Parâmetros microbiológicos (MS, LB) e ácido láctico - baseline, 2 semanas	ECR cruzado, duplo-cego 4 fases: limpeza- intervenção (2 semanas)- washout (3 semanas)- intervenção (2 semanas) - Grupo probiótico e grupo placebo	18 adultos com contagem moderada-alta de MS salivares, sem lesão visível de cárie aberta ou doença periodontal - média 26anos	Comprimido - 2 semanas (3 vezes por dia)	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938 e ATCC PTA 5289 (10 <sup>8</sup> CFU cada)

Tabela 16 : Características gerais dos ECR's relacionados com a cariologia, a constituição do biofilme/microbiota, os parâmetros imunológicos salivares (microbiota oral e parâmetros imunológicos salivares)

Descrição dos ECR's relacionados com a cariologia, a constituição do biofilme/microbiota, os parâmetros imunológicos salivares (microbiota oral)					
Referência Condição oral	Parâmetros avaliados Tempos de avaliação	Desenho estudo Grupos de estudo	Tamanho amostra (no fim do estudo) Idade ou faixa-etária	Protocolo da implementação de probiótico(s): Veículo Tempo de administração	Estirpe(s) probiótica(s) utilizada(s)
<b>Marttinen et al., 2012</b>  <b>Biofilme dentário e produção de ácido</b>	Parâmetros microbiológicos ( <i>MS</i> , <i>LB</i> ) e ácido láctico na placa supragengival Colonização probióticos - <i>baseline</i> , 2 semanas	ECR cruzado, duplo-cego 4 fases: <i>washout</i> (3 semanas)- 1º probiótico (2semanas)- <i>washout</i> (5 semanas)- 2º probiótico (2 semanas) - Grupo probiótico 1: <i>L. rhamnosus</i> GG Grupo probiótico 2: <i>L. reuteri</i> SD2112 e PTA 5289	13 adultos com contagem <i>MS</i> >104CFU/mL, baixos escores de CPOD - média 25,3anos	Comprimido - 2 semanas (2 vezes ao dia)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG ou <i>Lactobacillus reuteri</i> SD2112 e PTA 5289
<b>Keller et al., 2012</b>  <b>Microbiota oral</b>	Parâmetros microbiológicos ( <i>MS</i> amostras de saliva estimulada) - <i>baseline</i> , 1, 6, 12 semanas	ECR, multicêntrico, duplo-cego, paralelo Dia 0: profilaxia profissional + verniz de CHX 1% e de tiomerina 1% + FMD (CHX 0,2% - 2 dias 2x/dia) - Grupo probiótico e grupo controle	62 adultos com contagem de <i>MS</i> salivares >6.10 <sup>5</sup> CFU/mL - 19-35 anos	Pastilha - 6 semanas (2 vezes por dia)	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938 e ATCC PTA 5289
<b>Jäsberg et al., 2018</b>  <b>Níveis de MMP-8-9 e TIMP-1 salivares</b>	Parâmetros imunológicos (MMP-8-9 e TIMP-1 através amostras 4mL de saliva por ELISA), clínicos (PI, GI), microbiológicos ( <i>MS</i> e <i>LB</i> ), bioquímicos (fluxo salivar) - <i>baseline</i> e 4 semanas	ECR controlado por placebo, duplo-cego - Grupo probiótico Grupo placebo (pastilha 4x/dia, com 50% de xilitol e 46% de sorbitol)	60 adultos com nível de <i>MS</i> salivar >10 <sup>3</sup> CFU/mL - média 24anos	Pastilha - 4 semanas (2 vezes por dia)	<i>Bifidobacterium animalis subsp. lactis</i> BB-12 e <i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG (2.10 <sup>9</sup> células)
<b>Braathen et al., 2017</b>  <b>Níveis de IgA e citocinas</b>	Parâmetros imunológicos (IgA, IL-1β, IL-6, IL-8 e IL-10 salivares) - <i>baseline</i> , 3, 6, 9, 12 semanas	ECR cruzado controlado por placebo, duplo-cego Intervenção (3semanas) – <i>washout</i> (3semanas) – intervenção (3 semanas)- <i>washout</i> (3semanas) - Grupo probiótico e grupo placebo	41 adultos - 18-40anos	Pastilha - 3 semanas (2 vezes por dia)	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938 (10 <sup>9</sup> CFU) e ATCC PTA 5289 (2.10 <sup>9</sup> CFU)
<b>Jørgensen et al., 2016</b>  <b>Níveis de IgA e citocinas</b>	Parâmetros imunológicos (sIgA, IL-1β, IL-6, IL-8 e IL-10 através amostras de saliva) - <i>baseline</i> . 3. 6. 9. 12 semanas	ECR cruzado, controlado por placebo, duplo-cego Intervenção (3semanas)- <i>washout</i> (3semanas)- intervenção (3semanas) - Grupo probiótico e grupo placebo	41 adultos - 18-32anos	Losango - 3 semanas (2 vezes por dia)	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938 e ATCC PTA 5289
<b>Wattanarat et al., 2015</b>  <b>Nível HNP1-3 e microflora cariogénica</b>	Parâmetros imunológicos (HNP1-3 salivares), microbiológicos ( <i>MS</i> e <i>LB</i> ), clínicos (cárie) - <i>baseline</i> , 3, 6, 12 meses	ECR controlado, duplo-cego - Grupo probiótico Grupo controle (leite padrão)	60 crianças com cárie em dois ou menos dentes ausência de lesões ativas profundas não tratadas, ausência de periodontite - 13-15 anos	Leite em 5g pó com 50mL água - 6 meses (1 vez por dia)	<i>Lactobacillus paracasei</i> SD1

O estudo de Thakkar (2013) (Tabela 15) olhou para a influência dos probióticos *L. acidophilus*, *L. rhamnosus*, *Bifidobacterium longum* e *S. boulardii* na placa dentária em crianças comparado com o uso de CHX 0,12% e placebo. A acumulação de placa após 14 dias de consumo de pastilhas probióticas foi reduzida significativamente nos grupos CHX e probiótico, sem diferença entre eles ao fim de duas semanas de intervenção e três semanas depois, comparativamente com o grupo placebo ( $P=0,001$ ).

No ensaio de Burton *et al.* (2013) (Tabela 15) em que o *Streptococcus salivarius* M18 foi administrado em crianças durante 3 meses sob a forma de pastilhas, observou-se uma diminuição significativa nos *scores* de placa no fim da intervenção no grupo teste (sobretudo em crianças com altos *scores* de placa à partida) ( $P=0,022$ ). Após um mês de intervenção probiótica, a redução dos *scores* em ambos os grupos resultou da profilaxia profissional, contudo os *scores* foram mais baixos no grupo probiótico em todos os períodos de avaliação (*baseline*, 1, 3 e 7 meses:  $6\pm 3,3$ ,  $3,4\pm 2,1$ ,  $5,3\pm 3,2$  e  $4,7\pm 2,7$ , respetivamente no grupo probiótico vs.  $6,9\pm 3,2$ ,  $4,1\pm 2,6$ ,  $7\pm 4,1$ ,  $4,4\pm 2,9$  no grupo placebo). Os efeitos da combinação probiótica foram maiores durante o período de administração. Observou-se que a taxa de adesão foi relativamente alta ( $>80\%$ ), mas só 22% das crianças do grupo probiótico foram colonizadas pelo *S. salivarius* M18. A maior redução de *S. mutans* nos indivíduos colonizados pelo probiótico (embora sem diferença significativa entre os grupos ( $P>0,05$ )) revelou que a colonização é importante para o seu efeito. Aos 7 meses de monitorização, os resultados foram similares entre os grupos em todos os parâmetros avaliados ( $P>0,05$ ), ou seja, o efeito foi temporário e não durou mais de 4 meses após descontinuação. A contagem de *S. mutans* reduzida no grupo probiótico sugere que o *S. salivarius* M18 pode participar na atividade anti-cárie. Não houve mudança populacional detetável nos microrganismos não alvo ( $P>0,05$ ), os níveis de *S. salivarius*, *Lactobacillus spp.*, estreptococos hemolíticos e *Candida spp.* foram semelhantes entre os grupos ( $P>0,05$ ). Contudo, a cultura microbiológica não é suficiente para identificar alterações mínimas da composição microbiana, se houver. Os resultados são encorajadores para desenvolver ensaios com amostras maiores.

Sarmiento *et al.* (2019) (Tabela 15) avaliaram a influência da ingestão por 2 semanas de *L. casei* sobre a microbiota oral de crianças. Observaram que tanto no grupo controlo que ingeriu o Petit-suisse, como no grupo probiótico que ingeriu o Petit-suisse suplementado por *L. casei*, houve redução significativa dos *S. mutans* salivares e do

número total de microrganismos salivares ( $P<0,05$ ). Os grupos foram ainda capazes de diminuir a densidade de *A. actinomycetancomitans* e *P. gingivalis* ( $P<0,05$ ), mas *Candida albicans* não sofreu alteração ( $P>0,05$ ). A similaridade nestes resultados pode provir do pH semelhante entre os produtos lácteos ingeridos, capacidade tampão e presença de lactato de cálcio (que tem efeito anti-cariogénico) que contribuíram para influenciar o ambiente salivar.

Rungsri *et al.* (2017) (Tabela 15) observaram diminuição significativa de *S. mutans* e do número total de microrganismos após consumo de leite contendo *L. rhamnosus* SD11 em adultos ao fim de 4 semanas de intervenção e após 4 semanas de descontinuação ( $P<0,01$ ). Também neste estudo, a contagem de *Lactobacillus spp.* aumentou significativamente em 4 semanas ( $P<0,05$ ) em ambos os grupos porque ambos consumiram lactobacilos (o grupo controlo ingeriu *Lactobacillus bulgaricus*). No entanto, a contagem reduziu-se na 8ª semana no grupo controlo ( $P=0,038$ ). Em paralelo o probiótico foi detetado até a 8ª semana em 80% dos pacientes, *i.e.* o *L. rhamnosus* SD11 oral foi capaz de colonizar mais tempo que o *L. bulgaricus*. O CPOD, PI e GI melhoraram mas sem diferença entre os grupos por causa da profilaxia ( $P>0,05$ ). O pH foi ligeiramente inferior no grupo controlo após 1 mês.

Toiviainen *et al.* (2015) (Tabela 15) usaram uma combinação probiótica contendo *L. rhamnosus* GG e *B. lactis* BB-12 para avaliar os efeitos de pastilhas probióticas, implementadas durante 4 semanas sobre a microbiota oral em adultos. Não houve alteração na contagem de *S. mutans* salivares, nem de *Lactobacillus spp.* Em contrapartida, houve redução significativa dos PI ( $P=0,016$ ) e GI ( $P=0,012$ ) no grupo probiótico. No grupo controlo não houve mudança nenhuma destes índices. Os investigadores referiram que os participantes não tinham periodontopatogénicos no início, e que, o conteúdo de polissacaridos da placa não mudou, *i.e.* estes não são responsáveis pela redução dos índices. Isto significa que o probiótico reduziu as condições periodontais sem provocar mudanças na microbiota oral, nem alteração na capacidade de adesão e formação de placa.

M. K. Keller *et al.* (2012) (Tabela 16) administraram em pastilhas por 6 semanas o *L. reuteri* DSM 17938 e ATCC PTA 5289 a adultos após desinfeção prévia com CHX 0,2% durante 2 dias 2 vezes ao dia. Os grupos teste e controlo não apresentaram diferenças na redução da contagem de *S. mutans* salivares ( $P>0,05$ ), nem no perfil

microbiano (níveis detetáveis e estáveis de *Actinomyces oris*, *Veillonella párvula*, *Streptococcus mitis*, *F. nucleatum*, *Actinomyces odontolyticus*, *S. salivarius*, *C. albicans*, *S. sanguinis* semelhantes em ambos os grupos em todos os períodos de monitorização). A ingestão de *L. reuteri* após desinfecção prévia com CHX não trouxe benefícios sobre a microbiota oral, talvez porque o biofilme em população adulta não é tão maleável como o da idade infantil, ou, porque esta estirpe não é adequada para atrasar o crescimento de *S. mutans* e alterar os microrganismos do biofilme. Seria interessante avaliar o impacto de outras espécies e estirpes.

Romani Vestman *et al.* (2015) (Tabela 15) avaliaram o consumo por 12 semanas de pastilhas de *L. reuteri* DSM 17938 e ATCC PTA 5289. Tal como no ensaio de M. K. Keller *et al.* (2012), o *L. reuteri* não afetou de forma major a diversidade microbiana do biofilme. Foram relatadas pelos investigadores algumas variações no grupo teste que normalizaram um mês após descontinuação. O grupo teste teve contagem salivar de *Lactobacillus spp.* (log CFU/ml saliva) significativamente maior durante a intervenção, e, até um mês depois ( $P < 0,001$ ). A deteção das estirpes de *L. reuteri* DSM e PTA por PCR no grupo teste foi de 68,2% e 66,7%, respetivamente, e de 28,6% e 19%, respetivamente um mês depois. Após cultura, nenhuma *L. reuteri* foi encontrada às 12 semanas no grupo teste, mas a PCR exibiu a sua presença em 6/7 indivíduos escolhidos.

Os dois estudos cruzados seguintes avaliaram a capacidade de probióticos em produzir ácido láctico e os seus efeitos sobre a microbiota oral, quando administrados em comprimidos durante duas semanas em adultos. Mette K. Keller & Twetman (2012) (Tabela 15) utilizaram *L. reuteri* DSM 17938 e ATCC PTA 5289 e mencionaram que o seu consumo diário não proporcionou aumento da acidez na placa, as concentrações de ácido láctico foram semelhantes quer no início e quer no fim, tanto no grupo teste como no grupo placebo. Martinen *et al.* (2012) (Tabela 16) após administração de *L. rhamnosus* GG (grupo 1) ou de *L. reuteri* D2112 e PTA 5289 (grupo 2), não observaram alteração na acidogenicidade da placa; todas as amostras de placa em suspensão tiveram concentrações detetáveis de ácido láctico ( $\mu\text{g/mL}$ ), após fermentação por frutose e xilitol. A contagem de *S. mutans* não foi afetada significativamente nos grupos 1 ( $P=0,407$ ) e 2 ( $P=0,076$ ). O aumento significativo de lactobacilos foi observado com o *L. reuteri* ( $P=0,011$ ) e não com o *L. rhamnosus* ( $P=0,131$ ). Os autores não associaram a produção de ácido e a contagem de *S. mutans* e *Lactobacillus spp.* Através destes resultados



notamos que os lactobacilos usados como probióticos produzem ácido, mas não o suficiente para alterar o teor acídico da placa.

Os resultados dos ensaios apresentados encorajam a elaboração de outras investigações sobre a microbiota oral com maior tamanho de amostra, pois os lactobacilos probiótico não tiveram influência negativa, e, mostraram-se em harmonia com a microflora oral. Deve ser mais aprofundada a avaliação dos probióticos comensais orais para perceber os mecanismos que ajudaram a uma colonização mais duradoura (Bhalla *et al.*, 2015). Por outro lado, os resultados sugerem que a placa pode não servir de reservatório para os probióticos orais ingeridos (Marttinen *et al.*, 2012). A administração de probióticos deve ser considerada diária com uma dosagem suficiente para ter um impacto benéfico no biofilme oral (Rungsri *et al.*, 2017). As técnicas para identificar os microrganismos e quantificá-los devem ser analisadas com cuidado, na medida em que, várias limitações de utilização lhe são atribuídas e que todas as espécies da flora oral ainda não são totalmente conhecidas e variam de indivíduo para indivíduo. Leves diferenças inter/intra-individuais aparecem na capacidade de síntese do ácido láctico, o que faz pensar que os efeitos dos probióticos podem depender também do hospedeiro (ex. a colonização de probiótico reflete variações genéticas no recetor *scavenger* de macrófagos para ligação bacteriana, como é o caso do epítipo de antígeno salivar de gp340, MUC5-7 e ABO) (Romani Vestman *et al.*, 2015).

### iii. Probióticos e parâmetros imunológicos salivares

A saliva desempenha várias funções na regulação do ecossistema oral através do fluxo salivar, pH, capacidade tampão, presença de nutrientes, enzimas antimicrobianas e capacidade imunomoduladora. As imunoglobulinas são secretadas pelas glândulas salivares (sob forma diméricas, em sIgA) que se ligam e aglutinam aos microrganismos para interferir na aderência dos patogénicos (Jørgensen *et al.*, 2016) (Jäsberg *et al.*, 2018). Além disso, as metaloproteases de matriz (MMPs) presentes na saliva e no fluido gengival podem contribuir para a defesa do hospedeiro, regulando as respostas imunes e anti-inflamatórias ; as TIMP, inibidores tecidulares das MMPs, regulam a atividade das MMPs (Jäsberg *et al.*, 2018). Os péptidos de neutrófilos humanos 1-3 (HNP1-3, imunocitos inatos) expressos nas células ductais das glândulas salivares mandibulares e secretados

na saliva, ou produzidos por neutrófilos e libertados no fluido gengival têm atividade antimicrobiana e os seus níveis são mais baixos em crianças suscetíveis a cárie (Wattanarat *et al.*, 2015). Os ensaios clínicos seguintes tentaram compreender o efeito imunomodulador de vários probióticos na cavidade oral.

O estudo de Jäsberg *et al.* (2018) (Tabela 16) avaliou a influência do consumo por 4 semanas de pastilhas contendo *B. animalis subsp. lactis* BB-12 e *L. rhamnosus* GG em adultos com saúde gengival. O PI e GI do grupo probiótico foram reduzidos significativamente ( $P=0,016$  e  $P=0,013$ ), sem diferença com o grupo controlo ( $P=0,176$  e  $P=0,571$ ). No grupo probiótico, a diminuição de TIMP-1 ( $P=0,003$ ), aumento de MMP-9 ( $P=0,007$ ) e aumento de MMP-9/TIMP-1 ( $P=0,002$ ) foram significativos, no entanto a administração dos probióticos não alterou MMP-8 ( $P=0,417$ ) nem a taxa de fluxo salivar ( $P=0,119$ ). Não houve diferença significativa nestes parâmetros com o grupo controlo ( $P>0,05$ ). No grupo probiótico, não houve correlação entre a taxa de secreção salivar e os níveis salivares de MMP-8/9 ou TIMP-1 ( $P>0,05$ ), nem correlação entre MMP-8/9, TIMP-1 e contagens de *S. mutans* ou *Lactobacillus spp.* ( $P>0,05$ ). Contudo, no grupo probiótico houve correlação positiva entre MM-9 e GI ( $R=0,354$ ,  $P<0,001$ ). No grupo controlo, houve correlação positiva entre GI e MMP-8/TIMP-1 ( $P=0,03$ ). Estes resultados indicam que os probióticos orais utilizados podem participar no aumento de MMP-9 e na redução de TIMP-1.

Jørgensen *et al.* (2016) e Braathen, Ingildsen, Twetman, Ericson, & Jørgensen (2017) (Tabela 16) estudaram a influência de *L. reuteri* DSM 17938 e ATCC PTA 5289 sobre os níveis de sIgA e citocinas salivares (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10) após o seu consumo por três semanas em adultos. Jørgensen *et al.* (2016) concluíram que em indivíduos saudáveis, a administração de *L. reuteri* não modulou a resposta imune oral. Com efeito, não houve diferença significativa nos níveis de sIgA ou IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, IL-10 entre os grupos em nenhum momento de avaliação ( $P>0,05$ ). Braathen *et al.* (2017) também não mostrou alteração nos níveis de citocinas salivares nos indivíduos colonizados por *L. reuteri* (PCR positiva) em comparação com os não colonizados (PCR negativa) ( $P>0,05$ ). No entanto, ao contrario de Jørgensen *et al.* (2016) no grupo probiótico de Braathen *et al.* (2017) houve níveis maiores e significativos de sIgA

salivares em indivíduos colonizados pela estirpe probiótica ( $P<0,05$ ).

Wattanarat *et al.* (2015) (Tabela 16) avaliaram os níveis salivares de HNP1-3 após suplementação por *L. paracasei* SD1 em leite durante seis meses em adolescentes. O objetivo era avaliar se, pelo aumento da imunidade local, haveria prevenção da cárie. Aos 3 e 6 meses (T3 e T6) os níveis de HNP1-3 aumentaram significativamente no grupo probiótico (T3=1,0250 vs. 0,5145  $\mu\text{g} / \text{mg}$  – T6= 1,1470 vs. 0,5415  $\mu\text{g} / \text{mg}$ ;  $P<0,001$ ), e diminuíram progressivamente nos seis meses após descontinuação ( $P<0,05$ ). No grupo probiótico quando comparado com o controlo, a contagem de *S. mutans* foi reduzida significativamente em T3 ( $P<0,001$ ) e T6 ( $P<0,01$ ). Em paralelo, a contagem de *Lactobacillus spp.* aumentou significativamente até seis meses após descontinuação sugerindo uma capacidade retentiva prolongada do probiótico ( $P<0,01$ ). Houve correlação positiva no grupo probiótico entre HNP1-3 salivar e contagem de *Lactobacillus spp.* ( $R=0,376$ ,  $P<0,001$ ), e correlação negativa entre contagens *S. mutans* e *Lactobacillus spp.* ( $R=-0,282$ ,  $P=0,002$ ). Não houve correlação entre o aumento de HNP1-3 e redução de *S. mutans* ( $R=-0,114$ ,  $P=0,216$ ). O número de cáries nas fossas e fissuras diminuiu significativamente no grupo probiótico seis meses após a intervenção ( $P=0,01$ ) mas não houve diferença na cárie das superfícies lisas entre os grupos ( $P=0,269$ ).

Em resumo, estes ensaios clínicos demonstraram que alguns probióticos podem aumentar a concentração de sIgA e péptidos HNP1-3 na saliva. No caso de péptidos HNP1-3 a sua maior concentração na saliva foi associada a uma menor densidade de cárie dentária em crianças nos seis meses após o fim da toma dos probióticos. Contudo, os resultados destes estudos são insuficientes, para recomendar a toma diária de probióticos para melhorar a saúde da cavidade oral. São precisos mais ensaios com mais pessoas, e com menos heterogeneidade, para esclarecer o verdadeiro papel imuno-regulador dos probióticos orais e para avaliar melhor as moléculas efetoras envolvidas na imunomodulação oral (Wattanarat *et al.*, 2015).

### c. Outras aplicações dos probióticos em saúde oral

Tabela 17 : Características gerais dos ECR's relacionados com outras aplicações de probióticos em saúde oral

Características gerais dos ECR's relacionados com outras aplicações de probióticos em saúde oral					
Referência Condição oral	Parâmetros avaliados Tempos de avaliação	Desenho estudo Grupos de estudo	Tamanho amostra (no fim do estudo) Idade ou faixa-etária	Protocolo da implementação de probiótico(s): Veículo Tempo de administração	Estirpe(s) probiótica(s) utilizada(s)
<b>Suzuki et al., 2014</b>  <b>Halitose e saúde oral</b>	Parâmetros clínicos (escores organolépticos OLT, VCS, PD, PI, sarro lingual, fluxo salivar), microbiológicos - <i>baseline</i> , 14 dias	ECR cruzado, controlado por placebo, duplo-cego Intervenção 14 dias - <i>washout</i> 2 semanas - intervenção 14 dias - Grupo probiótico (com 280 mg de xilitol por comprimido) Grupo placebo (xilitol 280mg/comprimido)	23 adultos com halitose - 22-67 anos	Comprimido - 14 dias (3 vezes por dia)	<i>Lactobacillus salivarius</i> WB21 (6,7.10 <sup>8</sup> colonias)
<b>Keller et al., 2012</b>  <b>Halitose</b>	Parâmetros clínicos (escores organolépticos, VCS Halimeter) - <i>baseline</i> , 14 dias	ECR cruzado controlado por placebo, duplo-cego Intervenção 2 semanas - <i>washout</i> 3 semanas - intervenção 2 semanas - Grupo probiótico Grupo placebo (pastilha contendo, isomalte, óleo de palma hidrogenada, esteres de sacarose de ácidos gordos, óleo de hortelã, sucralose sabor mentol)	25 adultos com sensação subjetiva de mau hálito - 19-25 anos	Pastilha - 2 semanas (2 vezes por dia)	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938 e ATCC PTA 5289 (10 <sup>8</sup> CFU)
<b>Keller &amp; Kragelund 2018</b>  <b>Candidíase em líquen plano oral</b>	Parâmetros microbiológicos (contagens <i>Candida spp.</i> ), clínicos (sintoma mucosa, dor VAS, escore gravidade líquen plano, PI, GI, necessidade tratamento sintomático) - Visitas: <i>baseline</i> , após tratamento convencional (3-4semanas), 16, 24 e 52 semanas	ECR controlado por placebo, duplo-cego 1º Tratamento convencional (antifúngicos, esteroides durante 3-4semanas) 2º intervenção - Grupo probiótico e grupo placebo	22 pacientes com líquen plano oral sintomático - média 67 anos	Losango - 16 semanas (3 vezes por dia)	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938 e ATCC PTA 5289
<b>Miyazima et al., 2017</b>  <b>Níveis orais de Candida spp.</b>	Parâmetros microbiológicos (contagens <i>Candida spp.</i> ) - <i>baseline</i> , 4, 8 semanas	ECR controlado por placebo, duplo-cego - Grupo teste 1: queijo suplementado por <i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM Grupo teste 2: queijo suplementado por <i>Lactobacillus rhamnosus</i> Lr-32 Grupo controle C: queijo controle	60 idosos portadores de próteses com <i>Candida spp.</i> oral, sem estomatite nem candidíase - N/A	Queijo - 8 semanas (1 vez por dia)	<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM ou <i>Lactobacillus rhamnosus</i> Lr-32 (8-9 log CFU/g)
<b>Kraft-Bodi et al., 2015</b>  <b>Candidíase oral</b>	Parâmetros microbiológicos (contagens <i>Candida spp.</i> , amostras de saliva e placa), clínicos (PI, GI) - <i>baseline</i> , 12 semanas	ECR controlado por placebo, duplo-cego - Grupo probiótico e grupo placebo	174 idosos - 60-102 anos	Pastilha - 12 semanas (2 vezes por dia)	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938 e ATCC PTA 5289
<b>Ishikawa et al., 2014</b>  <b>Candidíase oral</b>	Parâmetros microbiológicos (contagens <i>Candida spp.</i> ) - <i>baseline</i> , 5 semanas	ECR controlado por placebo, duplo-cego - Grupo probiótico e grupo placebo	55 idosos portadores de prótese maxilar total, sem sintomas de candidíase - > 60 anos	Cápsula - 5 semanas (1 vez por dia)	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> HS111, <i>Lactobacillus acidophilus</i> HS101 liofilizado, <i>Bifidobacterium bifidum</i> (3,3.10 <sup>7</sup> CFU cada)
<b>Li et al., 2014</b>  <b>Estomatite associada a Candida spp.</b>	Parâmetros clínicos (dor, hiperemia, escore VAS), microbiológicos ( <i>Candida spp.</i> , <i>LB</i> , <i>S. epidermitis</i> amostras de saliva e língua) - <i>baseline</i> , 2, 4 semanas	ECR controlado - Grupo teste: ATF (2% nistatina) + probiótico + bicarbonato de sódio 2% Grupo controle: ATF 2% nistatina + bicarbonato sódio 2%	65 adultos com lesão atrófica em parte ou toda a mucosa da língua com detecção positiva de <i>C. albicans</i> - 18-75 anos	Comprimido - 4 semanas (3 vezes por dia)	<i>Bifidobacterium longum</i> (5,9.10 <sup>6</sup> CFU em 0,5g de leite em pó desnatado por cp.), <i>Lactobacillus bulgaris</i> (5,9.10 <sup>5</sup> CFU em 0,5g de leite em pó desnatado por cp.), <i>Streptococcus thermophilus</i> (5,9.10 <sup>5</sup> CFU em 0,5g de leite em pó desnatado por cp.)

Tabela 18 : Características gerais dos ECR's relacionados com outras aplicações de probióticos em saúde oral

Características gerais dos ECR's relacionados com outras aplicações de probióticos em saúde oral					
Referência Condição oral	Parâmetros avaliados Tempos de avaliação	Desenho estudo Grupos de estudo	Tamanho amostra (no fim do estudo) Idade ou faixa-etária	Protocolo da implementação de probióticos(s): Veículo Tempo de administração	Estirpe(s) probiótica(s) utilizada(s)
<b>Gizani et al., 2016</b> <b>Ortodontia e white spot</b>	Parâmetros microbiológicos ( <i>MS, LB</i> salivares), clínicos (WSL, PI) - <i>baseline</i> , após remoção aparelho ortodôntico	ECR prospectivo, controlado por placebo, duplo-cego - Grupo probiótico e grupo placebo	85 pacientes com aparelho maxilar em pelo menos oito dentes anteriores - média 15,9 anos	Pastilha - 17 meses (1 vez por dia)	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938 e ATCC PTA 5289 (10 <sup>8</sup> bactérias vivas cada)
<b>Pinto et al., 2014</b> <b>Ortodontia</b>	Parâmetros microbiológicos (amostras de saliva e placa, contagens totais de <i>MS, LB</i> ) - <i>baseline</i> , 14 dias	ECR cruzado, controlado por placebo, duplo-cego 4 períodos: <i>run-in</i> (1 semana) – intervenção (2semanas)- <i>washout</i> (4semanas)-intervenção (2semanas) - Grupo teste: iogurte probiótico Grupo controle: iogurte normal	26 pacientes com tratamento ortodôntico fixo bi-maxilar - 10-30 anos	Iogurte 200g - 2 semanas (1 vez por dia)	<i>Bifidobacterium animalis subsp.lactis</i> DN-173010
<b>Ritthagol et al., 2014</b> <b>Fissura lábio-palatina e ortodontia</b>	Parâmetros clínicos (cárie), bioquímicos (pH salivar), microbiológicos ( <i>MS, LB</i> ) Colonização probiótico - <i>baseline</i> , 1, 2, 3, 4 semanas	ECR controlado por placebo, duplo-cego - Grupo A: probiótico 10g leite em pó com probiótico em 50mL de água Grupo B: controle	30 pacientes com fissura labiopalatina não sintomática tratados ortodonticamente - média 19 anos	Leite 4 semanas (1 vez por dia)	<i>Lactobacillus paracasei SD1</i>
<b>Jose et al., 2013</b> <b>Ortodontia</b>	Parâmetros microbiológicos (amostras de placa nas superfícies vestibulares em redor dos brackets dos incisivos laterais superiores, contagens de <i>MS</i> por PCR) - <i>baseline</i> , 30 dias	ECR, duplo-cego - Grupo 1: controle Grupo 2: probiótico sistêmico (200mg requeijão Active plus Nestle 1x/dia) + pasta dentífrica com fluor Grupo 3: pasta dentífrica probiótica (2x/dia)	60 pacientes com aparelho ortodôntico de fio reto (MBT, slot 0,022) - 14-29 anos	Pasta dentífrica (2x/dia) ou requeijão 200mg (1x/dia) durante 30 dias	N/A
<b>Twetman et al., 2018</b> <b>Ferida oral por biópsia</b>	Parâmetros clínicos (cicatrização, dor, escores VAS, necessidade outra medicação), parâmetros imunológicos (através exsudado da ferida, saliva) - 2, 5 e 8 dias	ECR, controlado por placebo, duplo-cego (estudo piloto) <i>Run-in</i> (1semana)-Biópsia (ferida padronizada) –intervenção (8dias)- <i>washout</i> 4 semanas- <i>run-in</i> (1semana) biópsia (ferida padronizada)- intervenção (8dias) - Grupos probiótico e placebo	10 adultos saudáveis com mucosa normal - 21-66 anos	Losango + gota óleo tópica 2mL - 1 semana (2 vezes por dia e 1 vez por dia) antes a ferida e 8 dias depois	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938 e ATCC PTA 5289 (5.10 <sup>8</sup> bactérias vivas cada para losango e 2.10 <sup>8</sup> CFU/mL cada para gota)
<b>Twetman et al., 2018</b> <b>Ferida oral por biópsia e MMPs, IFNs</b>	Parâmetros imunológicos (MMPs, IFNs, no exsudado da ferida) - 2, 5 e 8 dias	ECR cruzado, controlado por placebo, duplo-cego (estudo piloto) <i>Run-in</i> 1 semana- biópsia (ferida padronizada)- intervenção - <i>washout</i> 4 semanas- <i>run-in</i> (1semana)- biópsia (ferida padronizada)- intervenção (8dias) - Grupo probiótico e grupo placebo	10 adultos saudáveis com mucosa normal - 21-66 anos	Losango: 1 semana (2 vezes por dia) antes a ferida e 8 dias depois Gota óleo tópica: 8 dias após a ferida (1 vez por dia)	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM 17938 e ATCC PTA 5289 (5.10 <sup>8</sup> bactérias vivas cada para losango e 2.10 <sup>8</sup> CFU/mL cada para gota)
<b>Limaye et al., 2013</b> <b>Mucosite oral induzida por quimioterapia</b>	Parâmetros avaliados: mucosite oral, sinais vitais, níveis bacterianos e de hTFF1 na saliva e mucosa, veículo de entrega - ciclo1: todos os dias ciclo 2: <i>baseline</i> , dia 2, 7 e 14, até 1 ano	ECR controlado por placebo simples cego Ciclo 1: QT aparcimento mucosite oral (25 pessoas) Ciclo 2: intervenção (22 pessoas no fim) - Grupo teste: AG013 1x/dia Grupo teste: AG013 3x/dia Grupo teste: AG013 6x/dia Grupo controle: placebo	22 pacientes com LAHNC de célula escamosa recém-diagnosticada (QT: cisplatina, 5- FU, com ou sem docetaxel (PTF ou PF) com mucosite oral - média 54 anos	Bochecho 15mL - 14 dias (1 ou 3 ou 6 vezes por dia)	<i>Lactococcus lactis</i> (AG013) (2.10 <sup>11</sup> CFU/15mL (ou seja: 2.10 <sup>11</sup> ou 6.10 <sup>11</sup> ou 1.2.10 <sup>12</sup> CFU/dia para cada frequência de administração respetivamente))
<b>Sharma et al., 2012</b> <b>Mucosite oral induzida por quimioterapia e radioterapia</b>	Parâmetros avaliados: grau mucosite, qualidade de vida, peso corporal, nutrição, - N/A	ECR duplo-cego - Grupo probiótico Grupo placebo (açúcares e sais)	188 pacientes com RT radical na dose de 70 Gy (35 frações) durante 7 semanas (5 frações/semana) por acelerador linear/ campos paracelos/ opostos paracelos e blindagem medular a 44 Gy. QT concomitante com cisplatina (DDP) 40 mg/m2 semanalmente (7 doses: dias 1, 8, 15, 22, 29, 36, 43) a partir do dia 1 do tratamento de RT - média 51 anos	Pastilha - Durante a QT/RT e até 1 semana depois (6 pastilhas por dia)	<i>Lactobacillus brevis</i> CD2 (2.10 <sup>9</sup> células viáveis)

### **i. Papel dos probióticos em ortodontia**

O tratamento ortodôntico, devido a dificuldade de higienização por causa dos aparelhos, origina lesões brancas em torno dos brackets onde se acumulam *Streptococcus* do grupo *Mutans* capazes de desmineralizar o esmalte dentário e originar lesões cariosas. A aplicação local de fluor, antissépticos e antibióticos pode prevenir a acumulação de *S. mutans*. Os probióticos poderiam ser úteis como suplementos dietéticos diários para dificultar a colonização bacteriana e tornar menos virulento o biofilme dentário em pacientes portadores de aparelhos ortodônticos fixos ou removíveis (Jose *et al.*, 2013a) (Ritthagol, Saetang, & Teanpaisan, 2014). Foram analisados quatro estudos relacionados com o efeito de diferentes probióticos no âmbito da ortodontia.

O estudo de Jose *et al.* (2013a) (Tabela 18) avaliou dois meios de administração de probióticos (sistêmico com o requeijão e local com pasta dentífrica) e comparou os resultados com o controlo. Após 30 dias de implementação houve uma redução significativa quase mais do dobro dos níveis de *S. mutans* na placa em torno dos brackets quando comparado com o grupo controlo ( $P < 0,001$ ) havendo mesmo alguns pacientes sem *S. mutans* detetáveis (deteção por PCR). No entanto quando comparamos os grupos probióticos entre eles, não foi encontrada diferença significativa que justifica que um teve melhor efeito que o outro ( $P = 0,72$ ). A principal limitação deste estudo foi a não indicação dos probióticos utilizados.

Ritthagol *et al.* (2014) (Tabela 18) avaliaram os níveis de *S. mutans* e *Lactobacillus spp.* na saliva após ingestão de leite com *L. paracasei* SD1 por 4 semanas em adolescentes com fissura lábio-palatina não sindrómica tratados ortodonticamente. A contagem de *Lactobacillus spp.* aumentou e de *S. mutans* reduziu significativamente no grupo teste ( $P < 0,001$ ) em todos os tempos de avaliação quando comparado com os dados iniciais. O *L. paracasei* SD1 colonizou temporariamente a microbiota oral, foi detetado na saliva até 4 semanas após a cessação sem provocar mudanças no pH salivar (dados não mostrados). Os resultados sugerem que este probiótico poderá ser adequado para prevenir a cárie nesta população. Será interessante investigar o seu efeito numa amostra representativa da população geral.

O estudo de Pinto, Cenci, Azevedo, Epifanio, & Jones (2014) (Tabela 18), não atribuiu benefícios orais ao consumo por duas semanas de iogurte com *B. animalis subsp. lactis* DN-173010 em pacientes (10-30anos de idade) tratados ortodonticamente. Com efeito, houve uma redução similar de *S. mutans* na placa supragengival ( $P=0,985$ ) e na saliva ( $P=0,864$ ) nos grupos teste e controlo. Os níveis de *Lactobacillus spp.* foram semelhantes nos dois grupos ( $P=0,990$  na saliva e  $P=0,685$  na placa). Houve uma redução significativa na contagem microbiana total na placa supragengival nos dois grupos ( $P=0,008$  vs. *baseline* no grupo probiótico e  $P=0,002$  vs. *baseline* no grupo controlo) e não na saliva ( $P=0,503$  e  $P=0,083$ ). O efeito *Hawthorne* pode estar implicado nestes resultados (os participantes escovaram melhor os dentes durante o ensaio porque estavam vigiados). Os resultados comparáveis entre os grupos sugerem ainda que o veículo utilizado (iogurte) afeta as bactérias cariogénicas porque os produtos lácteos têm uma alta capacidade tampão e os seus componentes (cálcio, lactato de cálcio, compostos inorgânicos e orgânicos) atenuam a colonização dos patógenos e protegem o esmalte (Pinto *et al.*, 2014).

O ensaio de Gizani *et al.* (2016) (Tabela 18) não atribui vantagens ao uso de pastilha de *L. reuteri* durante 17 meses em pacientes portadores de aparelho ortodôntico maxilar. Não houve diferença na incidência de lesões brancas entre os grupos ( $P>0,05$ ), nem na contagem de *S. mutans* ( $P>0,05$ ). A contagem de *Lactobacillus spp.* salivar foi diminuída significativamente em ambos os grupos quando comparado com o início ( $P<0,05$ ). Isto pode significar que o probiótico não colonizou e que consequentemente não atuou, ou que um controlo insuficiente do biofilme, má higiene e grande acumulação/espessura de placa podem comprometer os efeitos do agente probiótico.

Em resumo, os *L. reuteri* e *B. animalis subsp. lactis* DN-173010 não contribuem para melhorar a saúde oral de pacientes tratados ortodonticamente.

## ii. Papel dos probióticos na halitose

A halitose tem etiologia múltipla, podendo ser causada pela ingestão de certos alimentos, má higiene oral, periodontite, infeções respiratórias, desequilíbrio da flora oral, consumo de tabaco, predisposição genética e consumos de medicamentos que secam a boca (Penala *et al.*, 2016) (Pol *et al.*, 2017). Os compostos voláteis de enxofre (VCS)

são os principais responsáveis pelo mau hálito: sulfureto de hidrogénio H<sub>2</sub>S, metil-mercaptano CH<sub>3</sub>SH (associado a doença periodontal) e dimetil-sulfeto (CH<sub>3</sub>SCH<sub>3</sub>) (Penala *et al.*, 2016). Na cavidade oral, estas substâncias resultam essencialmente da atividade metabólica dos microrganismos orais. O dorso da língua é o local principal onde se produzem os VCS (encontrados também em bolsas periodontais e na saliva). Vários fatores contribuem para a produção destes compostos como o tipo de bactérias (maior prevalência de bactérias anaeróbias gram-negativas), condições de pH salivar (alcalino), baixo potencial redox e presença de substratos sulfurados (cisteína, cistina e metionina). A terapia para diminuir a halitose e evitar um desconforto social passa pelos cuidados orais de forma a controlar a microflora oral. Os probióticos poderiam atuar como antibacterianos adjuvantes reduzindo a densidade das bactérias responsáveis da produção de VCS e consequentemente reduzindo a halitose (Suzuki *et al.*, 2014).

Penala *et al.* (2016) (Tabela 7) implementaram *L. salivarius* e *L. reuteri* em pacientes com periodontite crónica e halitose durante 14 dias. A halitose medida através de *scores* organoléticos reduziu-se significativamente no grupo teste ao 1 (P=0,007) e 3 meses (P=0,011) de monitorização.

Suzuki *et al.* (2014) (Tabela 17), com a administração de *L. salivarius* WB21 por 14 dias em adultos com halitose, realizada sem profilaxia previa, apresentaram redução significativa nos *scores* organoléticos em ambos os grupos (P<0,001 com o probiótico e P=0,002 com o controlo) sem diferença entre eles (P=0,532). Os níveis de VCS reduziram-se significativamente com o probiótico (P=0,002) e não no grupo controlo (P=0,306), com diferença significativa entre eles (P=0,019). Em paralelo houve redução significativa da PD (P=0,001) e das bactérias como *F. nucleatum* (conhecidas por produzir compostos malcheirosos) (P=0,020) no grupo probiótico quando comparado com o controlo. Este estudo sugere que *L. salivarius* WB21 pode ser útil no controlo do mau hálito.

Mette K. Keller *et al.* (2012) (Tabela 17) utilizaram o *L. reuteri* em pacientes que tinham a sensação subjetiva de mau hálito. O *L. reuteri* não afetou os níveis de VCS, no entanto, houve redução dos *scores* organoléticos (P<0,05) no grupo probiótico.



Em resumo, o consumo regular de probióticos *L. salivarius* e *L. reuteri* pode complementar os cuidados orais mecânicos no controlo da halitose.

### iii. Probióticos e *Candida spp.*

Devido ao seu potencial impacto no ecossistema microbiano da cavidade oral, os probióticos poderão contribuir para a prevenção da candidíase oral e servir de alternativa aos antifúngicos quando a doença ocorre (Ishikawa *et al.*, 2015; Kraft-Bodi, Jørgensen, Keller, Kragelund, & Twetman, 2015; Mendonça *et al.*, 2012; Miyazima, Ishikawa, Mayer, Saad, & Nakamae, 2017). O uso continuado de antifúngicos origina efeitos tóxicos (alterações hepáticas, náusea, vomito, diarreia) e favorece a emergência de estirpes resistentes como *Candida tropicalis*, *Candida glabrata* e *Candida guilliermondii*. (Ishikawa *et al.*, 2015; Kraft-Bodi, Jørgensen, Keller, Kragelund, & Twetman, 2015; Mendonça *et al.*, 2012; Miyazima, Ishikawa, Mayer, Saad, & Nakamae, 2017).

O género *Candida spp.* adere a mucosa oral e às resinas acrílicas das próteses dentárias (Song & Lee, 2017). A falta de higienização torna o microrganismo mais virulento aumentando o risco de candidíase oral, estomatite, micose oportunista invasiva e infeção nosocomial (Ishikawa *et al.*, 2015). Os indivíduos mais suscetíveis e com maior prevalência de candidíase a *Candida albicans* são os idosos, sobretudo os portadores de prótese dentária, os imunodeficientes, indivíduos com xerostomia, e indivíduos com problemas nutricionais (Ishikawa *et al.*, 2015; Kraft-Bodi, Jørgensen, Keller, Kragelund, & Twetman, 2015; Mendonça *et al.*, 2012; Miyazima, Ishikawa, Mayer, Saad, & Nakamae, 2017). Os produtos utilizados para limpar as próteses podem alterar a superfície da prótese, provocando rugosidades que favorecem a adesão e colonização por *Candida spp.* (Song & Lee, 2017).

Os ensaios clínicos seguintes avaliaram o papel dos probióticos nos níveis de *Candida spp.* em portadores de próteses dentária. Avaliaram ainda o papel dos probióticos na prevenção e gestão da candidíase oral.

No ensaio de Ishikawa *et al.* (2015) (Tabela 17), os participantes com candidíase assintomática e portadores de prótese total, tiveram *scores* bastantes reduzidos de *Candida spp.* ( $P < 0,0001$ ) após o consumo de cápsulas probióticas (*L. rhamnosus* HS111, *L. acidophilus* HS101 liofilizado, *Bifidobacterium bifidum*) durante 5 semanas independentemente dos níveis iniciais de *Candida spp.*, das espécies colonizadoras e da

idade da prótese ( $P>0,05$ ). Os resultados após contagem de *Candida spp.* provenientes das amostras da mucosa palatina foram os seguintes: 16,7% foram positivas para *Candida spp.* no grupo probiótico no fim do período experimental (carga  $3\log_{10}$  CFU/mL) e 92% no grupo placebo (carga  $3,7\log_{10}$  CFU/mL) (*p-value* não mencionada).

Kraft-Bodi *et al.* (2015) (Tabela 17) apresentaram resultados significativos em favor do grupo probiótico na redução da contagem de *Candida spp.* em idosos após implementação de *L. reuteri* por 12 semanas quando comparado com o uso do placebo ( $P<0,05$ ) (Tabela 19). Além disso, apareceu *Candida spp.* só em 3 participantes no grupo probiótico e 12 no grupo placebo que não tinham *Candida spp.* no início do estudo, indicando um possível efeito preventivo do probiótico no crescimento de *Candida spp.*

Tabela 19 : Prevalência de *Candida spp.* na saliva e na placa, antes e após a ingestão de pastilhas probióticas-[Kraft-Bodi *et al.* (2015)]

	Amostra saliva		<i>p-value</i>	Amostra placa		<i>p-value</i>
	<u>Baseline</u>	<u>12 semanas depois</u>		<u>Baseline</u>	<u>12 semanas depois</u>	
Grupo probiótico	72%	51%	<b><math>P&lt;0,05</math></b>	67%	50%	<b><math>P&lt;0,05</math></b>
Grupo placebo	66%	inalterado	$P>0,05$	69%	inalterado	$P>0,05$

Miyazima *et al.* (2017) (Tabela 17) estudaram a administração por 8 semanas de *L. acidophilus* NCFM (grupo 1) ou *L. rhamnosus* Lr-32 (grupo 2) em idosos portadores de próteses sem estomatite nem candidíase. Os três grupos de estudo (1, 2 e controle) tiveram no início contagens idênticas de *Candida spp.* ( $P>0,05$ ). Após quatro semanas, a redução foi significativa unicamente no grupo que ingeriu *L. acidophilus* ( $P<0,05$ ). Após oito semanas de ingestão de probióticos a redução dos níveis de *Candida spp.* foi significativa nos dois grupos probióticos, independentemente da estirpe, idade, tipo de prótese e doença sistêmica ( $P<0,05$ ).

O ensaio de Li *et al.* (2014) (Tabela 17) avaliou o consumo durante 4 semanas de comprimidos probióticos *Bifidobacterium longum*, *L. bulgaris* e *Streptococcus thermophilus* como adjuvante à terapia antifúngica da estomatite associada a *Candida spp.* Quer o grupo controle (nistatina local, bicarbonato sódico) quer o grupo probiótico (nistatina local, probiótico, bicarbonato sódico) apresentaram diminuição significativa da

dor e hiperemia na mucosa lingual ( $P < 0,001$ ), mas sem diferença entre eles ( $P < 0,05$ ). Houve redução significativa na prevalência de *Candida spp.* salivar após 2 e 4 semanas em ambos os grupos (passou de 100% para 8,21% no grupo probiótico,  $P < 0,001$  e para 34,6% no grupo controle,  $P = 0,003$ ). Esta redução não foi significativa no grupo probiótico quando comparada com o controle ( $P = 0,630$ ) às 2 semanas, mas foi às 4 semanas ( $P = 0,038$ ). No grupo probiótico, a detecção de *Streptococcus thermophilus* foi maior após 4 semanas (11,8% para 24,17%,  $P = 0,019$ ); *L. bulgaris* diminuiu após 2 semanas (73,52% para 45,26%,  $P = 0,049$ ) e voltou a aumentar após 4 semanas (65,41%). Os bacilos gram-negativos aumentaram no grupo controle após 4 semanas (16,11% para 46,28%,  $P = 0,026$ ).

O líquen plano é uma doença inflamatória crônica da mucosa oral muitas vezes associado a infecção secundária por *Candida spp.* oral até porque o seu tratamento se faz com corticosteroides que afetam a imunidade. O tratamento convencional da candidíase associada a o líquen plano leva a morbidade e risco de resistência. M. K. Keller & Kragelund (2018) (Tabela 17) avaliaram o consumo de *L. reuteri* em pacientes com líquen plano com candidíase oral, com o objetivo de promover uma simbiose ecológica e aliviar os sintomas da candidíase. Após terapia convencional (nistatina tópica) e tratamento da sintomatologia, os pacientes receberam os comprimidos de probióticos *L. reuteri* durante 16 semanas. Não houve tendência marcada em favor do grupo probiótico. Ambos os grupos apresentaram recidivas de candidíase oral nos mesmos pacientes com necessidade de tratamento adicional durante e após a intervenção. Não houve diferença na contagem de *Candida spp.* entre os grupos ( $P = 0,96$ ). Só o GI reduziu significativamente no grupo probiótico ( $P = 0,046$ ); os *scores* de dor foram menores no grupo probiótico ( $P = 0,037$ ).

Em síntese, os resultados são ainda pouco claros quanto ao verdadeiro impacto dos probióticos *L. reuteri*, *B. longum*, *L. bulgaris*, *S. thermophilus*, *L. acidophilus* e *L. rhamnosus* no tratamento das doenças orais causadas por *Candida spp.* Contudo a redução das contagens destas leveduras na boca de pessoas saudáveis que fazem probióticos sugere que a toma destes compostos pode prevenir e/ou retardar o aparecimento de doenças orais de etiologia fúngica. Seria interessante analisar, em paralelo do efeito antifúngico dos probióticos, os seus efeitos na superfície protética dentária em termos de rugosidade.

#### iv. Papel dos probióticos na cicatrização de feridas orais e na mucosite oral induzida por quimioterapia ou radioterapia

A cicatrização de feridas da mucosa oral envolve vários mediadores/moléculas inflamatórias e diversos fatores externos tais como a dieta com vitaminas e proteínas e a idade também têm um papel importante (Sharma *et al.*, 2012, 2017b; S. Twetman, Keller, Lee, Yucel-Lindberg, & Pedersen, 2018). Poucos ensaios clínicos investigaram o papel da administração tópica de probióticos na cicatrização de feridas orais e no tratamento da mucosite oral em pacientes submetidos a quimio-radioterapia. Os probióticos poderão participar indiretamente na cicatrização de lesões orais através de várias funções (Figura 9).

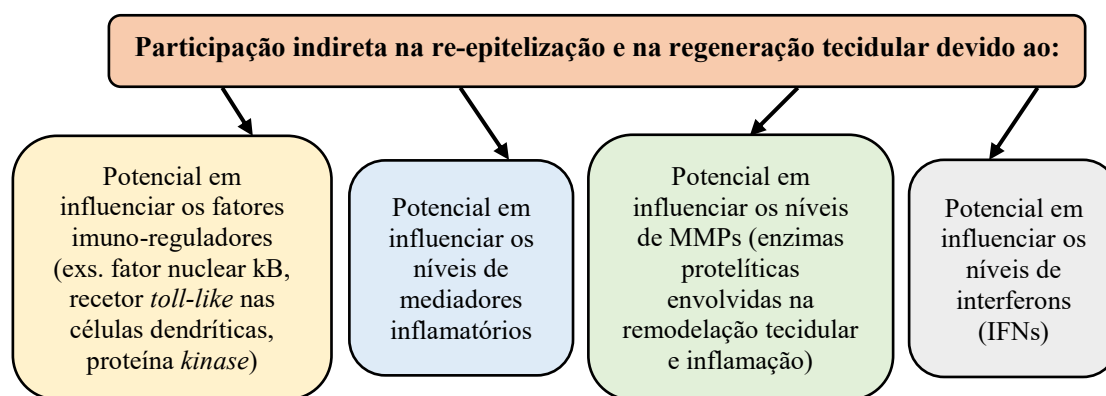


Figura 9 : Potenciais funções indiretas dos probióticos com impacto sobre a cicatrização de lesões orais

Na mucosa oral ulcerada existe um risco aumentado de infecção/gravidade devido à existencia de várias comunidades microbianas e de múltiplas interações bactéria-hospedeiro, e consequentemente a sua cicatrização pode estar comprometida. A mucosite oral induzida por terapia antineoplásica pode favorecer o aparecimento de infecções oportunistas, febre, anorexia, hemorragia, dor severa, disfagia e disgeusia. A administração de bactérias probióticas poderia alterar positivamente um ambiente oral vulnerável e substituir os agentes antimicrobianos que provocam ainda mais desconforto em pacientes com mucosite oral e ulcerações orais (Sharma *et al.*, 2012, 2017b; S. Twetman, Keller, Lee, Yucel-Lindberg, & Pedersen, 2018) (Limaye *et al.*, 2013a).

No estudo de S. Twetman *et al.* (2018) (Tabela 18), a aplicação de *L. reuteri* em adultos com mucosa saudável uma semana antes a realização de biopsia padronizada e uma semana depois não mostrou uma melhora na cicatrização, não houve diferença nos

resultados com o grupo placebo [dia 2 ( $P=0,08$ ), dia 5 ( $P=0,34$ ), dia 8 ( $P=0,31$ )]. O número de dias com dor (2,5) foi similar entre os grupos ( $P>0,05$ ), mas o nível de dor foi menor com o probiótico (8,7 vs. 11,9,  $P$  não mencionado). Os investigadores observaram que o grupo que consumiu *L. reuteri* apresentou menos eritema/edema e a fibrina recobriu mais rapidamente a ferida. Não houve complicação durante a cicatrização.

No estudo de Svante Twetman, Pedersen, & Yucel-Lindberg, (2018) (Tabela 18), o *L. reuteri* aplicado após realização de biopsia padronizada em adultos com mucosa saudável não conseguiu alterar os níveis de MMP1-3 e IFN- $\alpha$ 2, IFN- $\beta$  e IFN- $\gamma$  na ferida padronizada. A cicatrização não mostrou diferença entre os grupos, o exsudado, os níveis de proteína total reduziram ao longo do tempo, similarmente ( $P>0,05$ ).

Os resultados negativos observados nestes dois ensaios não podem ser generalizados/extrapolados em caso de ferida recorrente porque as populações de estudo foram adultos saudáveis com ferida padronizada e recente. Será necessário elaborar ensaios clínicos em pacientes com ferida crônica para ver se os probióticos têm resultados positivos ao nível da cicatrização.

Limaye *et al.* (2013) (Tabela 18) estudaram a administração em bochecho contendo o bacilo *Lactococcus lactis* (AG013) em pacientes com cancro de cabeça e pescoço localmente avançado de célula escamosa recém-diagnosticado que iam iniciar uma quimioterapia. O AG013 contém uma estirpe recombinante que protege a mucosa pela síntese de hTFF1. Foram analisados 4 grupos de estudo, 3 grupos testes que fizeram 1, 3 ou 6 bochechos/dia de AG013 e o grupo placebo. A percentagem média de dias com mucosite oral reduziu-se de 35% nos grupos que ingeriram AG013, e houve menos visitas de emergência (36% vs. 60%). Os pacientes placebo tiveram pelo menos 2 dias com mucosite oral enquanto 29% dos que tomaram o AG013 tiveram mucosite oral por 0 ou 1 dia. Não houve diferença na utilização de medicação adjuvante ou nutrição parental entre os grupos. Em relação a presença de AG013, na mucosa e na saliva, foi detetada logo após o bochecho, e ainda 90 minutos, 1, 7, 14 dias após o bochecho em número equivalentes nos 3 grupos testes. Os níveis de hTFF1 (na mucosa, saliva, soro) foram semelhantes nos grupos testes, independentemente da frequência administrada. Não houve qualquer infeção nos pacientes neutropénicos pelo que este estudo demonstrou que o probiótico em análise é seguro. A principal limitação deste estudo é a ausência de

valores de *p-value* que impede concluir sobre o efeito de AG013 na mucosite oral ulcerativa em pacientes que fazem quimioterapia (Limaye *et al.*, 2013).

Sharma *et al.* (2012) (Tabela 18) estudaram a administração de *L. brevis* CD2 pastilhas em pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço submetidos a quimio-radioterapia (70 Gy 35 frações durante 7 semanas + 44 Gy blindagem medular + cisplatina 40mg/m<sup>2</sup> 7 doses). Os resultados obtidos foram os seguintes: a incidência e gravidade da mucosite oral foi reduzida no grupo que consumiu as pastilhas de *L. brevis* CD2. O grupo probiótico apresentou mais pacientes sem mucosite, menos com mucosite grau III, IV. A proporção de pacientes com mucosite grau I e II foi similar entre os grupos. No grupo probiótico, mais pacientes terminaram o tratamento antineoplásico, menos necessitaram de medicamentos adjuvantes para controlar a dor associada a mucosite e menos levaram nutrição parental. A qualidade de vida foi melhor (sem diferença significativa com o placebo), a mucosite apareceu mais tarde, mas o tempo para a sua resolução foi similar entre os grupos (Tabela 20). *L. brevis* CD2 contribuiu para atenuar a mucosite oral e melhorar a qualidade de vida em pacientes submetidos a quimio-radioterapia.

Tabela 20 : Comparação entre o grupo probiótico e o grupo placebo de vários parâmetros clínicos após o consumo de pastilhas de *L. brevis* CD2, no manejo da mucosite oral em pacientes submetidos a quimio-radioterapia da cabeça e do pescoço-[Sharma *et al.* (2012)]

Parâmetros clínicos analisados	Grupo probiótico	Grupo placebo	<i>p-value</i>
Sem mucosite (em % pacientes)	28%	7%	P<0,001
Mucosite grau I e II (em % pacientes)	19%	15%	P<0,001
Mucosite grau III e IV (em % pacientes)	52%	77%	P<0,001
Terminaram o tratamento antineoplásico (em % pacientes)	92%	70%	P=0,001
Terapia adjuvante utilizada (em % pacientes)	30%	45%	P=0,02
Nutrição parental (em % pacientes)	22%	34%	P=0,09
Início mucosite após início terapia antineoplásica (média em dias)	22	18	P>0,05
Resolução mucosite (média em dias)	43	43	P>0,05

#### d. Efeitos adversos e segurança dos probióticos

A maioria dos ensaios clínicos randomizados selecionados sublinha a segurança face a utilização dos probióticos orais, os estudos não revelam toxicidade nem aparecimento de resistência (Nadkerny, Ravishankar, Pramod, Agarwal, & Bhandari, 2015b). Os efeitos colaterais são monitorizados pelo intermédio de questionários preenchidos diretamente pelos participantes a cada visita de *follow-up* como no estudo de Kuru *et al.* (2017); informações sobre a natureza, severidade, duração e início do efeito indesejável costumam ser recolhidas (Montero *et al.*, 2017). Os efeitos podem ser categorizados segunda a escala de avaliação de causalidade da OMS e escala de avaliação da severidade de Hartwig e Siegel modificada (Murugesan *et al.*, 2018).

Entre os efeitos colaterais prováveis, existem: aumento da síntese de ácidos pelos *Lactobacillus spp.* (devido as propriedades acidúrica e acidogénica da espécie) no biofilme com risco aumentado de desmineralização do esmalte e consequentemente aparecimento de cárie dentária (Mette K. Keller & Twetman, 2012); distúrbios gastrointestinais (dor gástrica, abdominal, diarreia, aceleração do peristaltismo/motilidade, náusea, vômito), sinais de infeção (febre, calafrios), mal-estar, reações alérgicas (*rash* cutâneo, dermatite, urticaria, coceira, dificuldade respiratória, inchaço), tonturas, cefaleias, gosto metálico ou sabor desagradável (Kuru *et al.*, 2017; Li *et al.*, 2014; Ritthagol *et al.*, 2014; Vicario *et al.*, 2013) (Limaye *et al.*, 2013a).

Os efeitos colaterais mais comuns são: aumento da motilidade intestinal, desconforto estomacal, náusea. A queixa principal é o sabor desagradável. Houve participantes que afirmaram obter melhoria no apetite e no trânsito intestinal após o consumo dos probióticos no estudo de Imran *et al.* (2015).

Iniesta *et al.* (2012) notaram um aumento do peristaltismo intestinal em 7 pacientes. Em Montero *et al.* (2017) a dor abdominal foi a mais frequente por causa do aumento do peristaltismo (4 no grupo probiótico e 1 no grupo placebo com pelo menos um efeito indesejável). No ensaio clínico de Morales *et al.* (2018) um indivíduo do grupo probiótico teve náusea. Alguns dos participantes do ensaio clínico de Murugesan *et al.* (2018) relataram dor abdominal, inchaço, náusea, diarreia e cefaleia em ambos os grupos. Toiviainen *et al.* (2015) relataram 2 pacientes com distúrbios gastrointestinais, *a priori*

não associados ao probiótico. Burton *et al.* (2013) referiram 4 indivíduos com reações adversas (3 com o probiótico, 1 com o placebo). No ensaio clínico de Pinto *et al.* (2014) um paciente do grupo controlo teve desconforto estomacal e 2 relataram um sabor menos agradável do probiótico. Kraft-Bodi *et al.* (2015) revelaram que 6% dos pacientes lamentaram-se de um “sabor forte”, alguns tiveram distúrbio gástrico (2 com o probiótico e 3 com o placebo). Por fim, Limaye *et al.* (2013a) observaram em 3 pacientes efeitos adversos associados a intervenção (1 no grupo placebo e 2 nos grupos de intervenção).

Os efeitos indesejáveis presentes quer em pacientes “placebo” quer em pacientes “probiótico” podem resultar de um dos componentes presentes na forma farmacêutica ou outros veículos utilizados para administrar o probiótico como o sorbitol, associado a diarreia em alguns dos participantes no estudo de Montero *et al.* (2017).

Os ensaios clínicos de Sharma *et al.* (2012) e de Limaye *et al.* (2013a) apresentaram efeitos colaterais mais severos, no entanto estes estiveram relacionados com a terapia antineoplásica em si e não ao consumo de probiótico(s) ou de placebo.

Resumindo, em 85 ensaios clínicos randomizados, 9 (10,6%) revelaram efeitos adversos leves; *i.e.*, em 5013 indivíduos analisados no total destes ensaios, cerca de 0,5% dos participantes tiveram efeitos adversos leves no grupo probiótico e cerca de 0,4 % no grupo placebo. A ausência de efeitos colaterais significativos reforça a segurança da terapia probiótica oral e encoraja a utilização dos suplementos probióticos para a saúde oral (Hedayati-Hajikand *et al.*, 2015b).

- e. Características dos diferentes probióticos utilizados nos ensaios clínicos (Anexo 1)**
- f. Outros parâmetros intervindo nos efeitos dos probióticos (Anexo 2)**
- g. Limitações dos estudos (Anexo 3)**
- h. Importância dos estudos *in vitro* e em animais antes a elaboração de ECR's (Anexo 4)**



## V. Conclusão

A utilização de bactérias probióticas é uma área de pesquisa em expansão em medicina dentária. Os resultados obtidos nos ensaios clínicos analisados são promissores apesar de mecanismos de ação ainda mal compreendidos dos probióticos. Os probióticos têm potencial para interagir com o hospedeiro de maneira favorável e são compatíveis com a microflora residente. Contudo é fundamental elaborar mais ensaios clínicos randomizados e controlados por placebo, de longo prazo, em larga escala para comprovar a eficácia, estabilidade no tempo dos efeitos e utilidade dos probióticos na saúde oral (nos parâmetros clínicos, microbiológicos e imunológicos), determinar os veículos mais adequados, as estirpes mais eficazes, a dosagem apropriada e a frequência de administração. Pesquisas adicionais são necessárias no que diz respeito a conformidade dos produtos e a sua aceitação pelas diferentes faixas-etárias.

É provável que as combinações sinérgicas de bactérias probióticas permitam uma maior eficácia clínica do que qualquer agente probiótico dado individualmente. É provável que os probióticos atuem sem colonizar ou por colonização provisória da microflora oral, pelo que um consumo diário é aconselhado e não interfere com o dia-a-dia. Os efeitos são espécies/estirpes dependentes, mas nenhuma bactéria exibe todas as propriedades desejáveis a um probiótico útil para as doenças orais. Como qualquer agente terapêutico, a sua ação é alterada/comprometida/limitada pela presença do biofilme oral. Por outro lado, a resposta à terapia probiótica não é universal, depende do hospedeiro e ainda não é bem percebida. É preciso perceber melhor os mecanismos de ação dos probióticos e da resposta do hospedeiro aos probióticos.

Seja como for, os probióticos estão a caminho de ser aceites como produtos legítimos para a saúde oral, uma vez que parecem úteis na prevenção, tratamento e manutenção da ecologia oral. Contudo, mais evidências de maior qualidade são necessárias para efetuar recomendações na prática clínica dentária diária e para os considerar como estratégia preventiva autoadministrável ou terapia adjuvante/alternativa. Isto requererá ensaios clínicos padronizados para evitar heterogeneidade, para permitir comparações e assim reduzir os resultados contraditórios e controversos. Os ensaios

clínicos randomizados são as ferramentas mais rigorosas para estabelecer uma relação entre a terapia probiótica e o efeito alcançado e limitar os vieses.

Os probióticos orais são seguros, proporcionam benefícios para o ecossistema oral em termos periodontológico, cariológico, na halitose, candidíase, ortodontia, e influenciam favoravelmente a microbiota. As áreas em que os probióticos devem ser mais desenvolvidos no futuro são as feridas orais crônicas, a mucosite oral em pacientes submetidos a quimio-radioterapia da cabeça e pescoço. Também, pesquisas *in vivo* no âmbito da endodontia e traumatologia dentária poderiam emergir.

## VI. Bibliografia

- Alamoudi, N. M., Almagbadi, E. S., El Ashiry, E. A., & El Derwi, D. A. (2018). Effect of Probiotic *Lactobacillus reuteri* on Salivary Cariogenic Bacterial Counts among Groups of Preschool Children in Jeddah, Saudi Arabia: A Randomized Clinical Trial. *Journal of Clinical Pediatric Dentistry*, 42(5), 331–338. <https://doi.org/10.17796/1053-4625-42.5.2>
- Alanzi, A., Honkala, S., Honkala, E., Varghese, A., Tolvanen, M., & Söderling, E. (2018). Effect of *Lactobacillus rhamnosus* and *Bifidobacterium lactis* on gingival health, dental plaque, and periodontopathogens in adolescents: a randomised placebo-controlled clinical trial. *Beneficial Microbes*, 9(4), 593–602. <https://doi.org/10.3920/BM2017.0139>
- Alkaya, B., Laleman, I., Keceli, S., Ozcelik, O., Cenk Haytac, M., & Teughels, W. (2017). Clinical effects of probiotics containing *Bacillus* species on gingivitis: a pilot randomized controlled trial. *Journal of Periodontal Research*, 52(3), 497–504. <https://doi.org/10.1111/jre.12415>
- Ashwin, D., Ke, V., Taranath, M., Ramagoni, N. K., Nara, A., & Sarpangala, M. (2015). Effect of Probiotic Containing Ice-cream on Salivary Mutans Streptococci (SMS) Levels in Children of 6-12 Years of Age: A Randomized Controlled Double Blind Study with Six-months Follow Up. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 9(2), ZC06-09. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2015/10942.5532>
- Bafna, H. P., Ajithkrishnan, C. G., Kalantharakath, T., Singh, R. P., Kalyan, P., Vathar, J. B., & Patel, H. R. (2018). Effect of short-term consumption of amul probiotic yogurt containing *Lactobacillus acidophilus* La5 and *Bifidobacterium lactis* Bb12 on salivary streptococcus mutans count in high caries risk individuals. *International Journal of Applied and Basic Medical Research*, 8(2), 111. [https://doi.org/10.4103/ijabmr.IJABMR\\_447\\_16](https://doi.org/10.4103/ijabmr.IJABMR_447_16)
- Bhalla, M., Ingle, N. A., Kaur, N., & Yadav, P. (2015). Mutans streptococci estimation in saliva before and after consumption of probiotic curd among school children. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*, 5(1), 31–34. <https://doi.org/10.4103/2231-0762.151970>
- Bohora, A., & Kokate, S. (2017). Evaluation of the Role of Probiotics in Endodontic Treatment: A Preliminary Study. *Journal of International Society of Preventive & Community Dentistry*, 7(1), 46–51. <https://doi.org/10.4103/2231-0762.200710>

- Braathen, G., Ingildsen, V., Twetman, S., Ericson, D., & Jørgensen, M. R. (2017). Presence of *Lactobacillus reuteri* in saliva coincide with higher salivary IgA in young adults after intake of probiotic lozenges. *Beneficial Microbes*, 8(1), 17–22. <https://doi.org/10.3920/BM2016.0081>
- Burton, J. P., Drummond, B. K., Chilcott, C. N., Tagg, J. R., Thomson, W. M., Hale, J. D. F., & Wescombe, P. A. (2013). Influence of the probiotic *Streptococcus salivarius* strain M18 on indices of dental health in children: a randomized double-blind, placebo-controlled trial. *Journal of Medical Microbiology*, 62(Pt\_6), 875–884. <https://doi.org/10.1099/jmm.0.056663-0>
- Caglar et al. (2015). A Quantitative Analysis of a Probiotic Storage Media for Avulsed Teeth. *Acta Stomatologica Croatica*, 49(1), 21–26. <https://doi.org/10.15644/asc49/1/3>
- Campus, G., Cocco, F., Carta, G., Cagetti, M. G., Simark-Mattson, C., Strohmenger, L., & Lingström, P. (2014). Effect of a daily dose of *Lactobacillus brevis* CD2 lozenges in high caries risk schoolchildren. *Clinical Oral Investigations*, 18(2), 555–561. <https://doi.org/10.1007/s00784-013-0980-9>
- Chandra et al. (2016). Effect of a Locally Delivered Probiotic in Periodontitis - Full Text View - ClinicalTrials.gov. Retrieved March 30, 2019, from <https://clinicaltrials.gov/ct2/show/NCT02645669>
- Cildir et al. (2012). (PDF) A Novel Delivery System of Probiotic Drop and Its Effect on Dental Caries Risk Factors in Cleft Lip/Palate Children. <http://dx.doi.org/10.1597/10-035>
- Deshmukh, M. A., Dodamani, A. S., Karibasappa, G., Khairnar, M. R., Naik, R. G., & Jadhav, H. C. (2017). Comparative Evaluation of the Efficacy of Probiotic, Herbal and Chlorhexidine Mouthwash on Gingival Health: A Randomized Clinical Trial. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 11(3), ZC13–ZC16. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2017/23891.9462>
- Dhawan, R., & Dhawan, S. (2013). Role of probiotics on oral health: A randomized, double-blind, placebo-controlled study. *Journal of Interdisciplinary Dentistry*, 3(2), 71. <https://doi.org/10.4103/2229-5194.126862>
- FAO/OMS. (2006). Food safety and quality: Probiotics. Retrieved March 30, 2019, from <http://www.fao.org/food/food-safety-quality/a-z-index/probiotics/en/>
- Flichy-Fernández, A. J., Ata-Ali, J., Alegre-Domingo, T., Candel-Martí, E., Ata-Ali, F., Palacio, J. R., & Peñarrocha-Diago, M. (2015). The effect of orally administered probiotic *Lactobacillus reuteri*-containing tablets in peri-implant mucositis: a double-blind

- randomized controlled trial. *Journal of Periodontal Research*, 50(6), 775–785. <https://doi.org/10.1111/jre.12264>
- French, J. R. (1953). Experiments in field settings. *Research methods in the behavioral sciences*, 1953, 98-135
- Galofré, M., Palao, D., Vicario, M., Nart, J., & Violant, D. (2018). Clinical and microbiological evaluation of the effect of *Lactobacillus reuteri* in the treatment of mucositis and peri-implantitis: A triple-blind randomized clinical trial. *Journal of Periodontal Research*, 53(3), 378–390. <https://doi.org/10.1111/jre.12523>
- Gizani, S., Petsi, G., Twetman, S., Caroni, C., Makou, M., & Papagianoulis, L. (2016). Effect of the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* on white spot lesion development in orthodontic patients. *European Journal of Orthodontics*, 38(1), 85–89. <https://doi.org/10.1093/ejo/cjv015>
- Hallström, H., Lindgren, S., Widén, C., Renvert, S., & Twetman, S. (2016). Probiotic supplements and debridement of peri-implant mucositis: a randomized controlled trial. *Acta Odontologica Scandinavica*, 74(1), 60–66. <https://doi.org/10.3109/00016357.2015.1040065>
- Hallström, H., Lindgren, S., Yucel-Lindberg, T., Dahlén, G., Renvert, S., & Twetman, S. (2013). Effect of probiotic lozenges on inflammatory reactions and oral biofilm during experimental gingivitis. *Acta Odontologica Scandinavica*, 71(3–4), 828–833. <https://doi.org/10.3109/00016357.2012.734406>
- Hasslöf, P., West, C. E., Videhult, F. K., Brandelius, C., & Stecksén-Blicks, C. (2013). Early intervention with probiotic *Lactobacillus paracasei* F19 has no long-term effect on caries experience. *Caries Research*, 47(6), 559–565. <https://doi.org/10.1159/000350524>
- Hedayati-Hajikand, T., Lundberg, U., Eldh, C., & Twetman, S. (2015). Effect of probiotic chewing tablets on early childhood caries--a randomized controlled trial. *BMC Oral Health*, 15(1), 112. <https://doi.org/10.1186/s12903-015-0096-5>
- Ikram, S., Hassan, N., Baig, S., Borges, K. J. J., Raffat, M. A., & Akram, Z. (2019). Effect of local probiotic (*Lactobacillus reuteri*) vs systemic antibiotic therapy as an adjunct to non-surgical periodontal treatment in chronic periodontitis. *Journal of Investigative and Clinical Dentistry*, e12393. <https://doi.org/10.1111/jicd.12393>
- Imran, F., Das, S., Padmanabhan, S., Rao, R., Suresh, A., & Bharath, D. (2015). Evaluation of the efficacy of a probiotic drink containing *Lactobacillus casei* on the levels of periodontopathic bacteria in periodontitis: A clinico-microbiologic study. *Indian Journal*

- of Dental Research: Official Publication of Indian Society for Dental Research*, 26(5), 462–468. <https://doi.org/10.4103/0970-9290.172033>
- Ince, G., Gürsoy, H., İpçi, Ş. D., Cakar, G., Emekli-Alturfan, E., & Yılmaz, S. (2015). Clinical and Biochemical Evaluation of Lozenges Containing *Lactobacillus reuteri* as an Adjunct to Non-Surgical Periodontal Therapy in Chronic Periodontitis. *Journal of Periodontology*, 86(6), 746–754. <https://doi.org/10.1902/jop.2015.140612>
- Iniesta, M., Herrera, D., Montero, E., Zurbriggen, M., Matos, A. R., Marín, M. J., ... Sanz, M. (2012). Probiotic effects of orally administered *Lactobacillus reuteri*-containing tablets on the subgingival and salivary microbiota in patients with gingivitis. A randomized clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, 39(8), 736–744. <https://doi.org/10.1111/j.1600-051X.2012.01914.x>
- Invernici, M. M., Salvador, S. L., Silva, P. H. F., Soares, M. S. M., Casarin, R., Palioto, D. B., ... Messoria, M. R. (2018). Effects of *Bifidobacterium* probiotic on the treatment of chronic periodontitis: A randomized clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, 45(10), 1198–1210. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12995>
- Ishikawa, K. H., Mayer, M. P. A., Miyazima, T. Y., Matsubara, V. H., Silva, E. G., Paula, C. R., ... Nakamae, A. E. M. (2015). A multispecies probiotic reduces oral *Candida* colonization in denture wearers. *Journal of Prosthodontics: Official Journal of the American College of Prosthodontists*, 24(3), 194–199. <https://doi.org/10.1111/jopr.12198>
- Iwasaki, K., Maeda, K., Hidaka, K., Nemoto, K., Hirose, Y., & Deguchi, S. (2016). Daily Intake of Heat-killed *Lactobacillus plantarum* L-137 Decreases the Probing Depth in Patients Undergoing Supportive Periodontal Therapy. *Oral Health & Preventive Dentistry*, 14(3), 207–214. <https://doi.org/10.3290/j.ohpd.a36099>
- Jäsberg, H., Tervahartiala, T., Sorsa, T., Söderling, E., & Haukioja, A. (2018). Probiotic intervention influences the salivary levels of Matrix Metalloproteinase (MMP)-9 and Tissue Inhibitor of metalloproteinases (TIMP)-1 in healthy adults. *Archives of Oral Biology*, 85, 58–63. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2017.10.003>
- Javid, A. Z., Amerian, E., Basir, L., Ekrami, A., & Haghighi-zadeh, M. H. (2015). Effects of Short-term Consumption of Probiotic Yogurt on *Streptococcus Mutans* and *lactobacilli* Levels in 18-30 Years Old Students with Initial Stages of Dental Caries in Ahvaz City. *Nutrition and Food Sciences Research*, 2(2), 6.
- Jørgensen, M. R., Keller, M. K., Kragelund, C., Hamberg, K., Ericson, D., Nielsen, C. H., & Twetman, S. (2016). *Lactobacillus reuteri* supplements do not affect salivary IgA or cytokine levels in healthy subjects: A randomized, double-blind, placebo-controlled,

- cross-over trial. *Acta Odontologica Scandinavica*, 74(5), 399–404.  
<https://doi.org/10.3109/00016357.2016.1169439>
- Jose, J. E., Padmanabhan, S., & Chitharanjan, A. B. (2013). Systemic consumption of probiotic curd and use of probiotic toothpaste to reduce *Streptococcus mutans* in plaque around orthodontic brackets. *American Journal of Orthodontics and Dentofacial Orthopedics: Official Publication of the American Association of Orthodontists, Its Constituent Societies, and the American Board of Orthodontics*, 144(1), 67–72.  
<https://doi.org/10.1016/j.ajodo.2013.02.023>
- Keller, M. K., Brandsborg, E., Holmstrøm, K., & Twetman, S. (2018). Effect of tablets containing probiotic candidate strains on gingival inflammation and composition of the salivary microbiome: a randomised controlled trial. *Beneficial Microbes*, 9(3), 487–494.  
<https://doi.org/10.3920/BM2017.0104>
- Keller, M. K., Hasslöf, P., Dahlén, G., Stecksén-Blicks, C., & Twetman, S. (2012). Probiotic supplements (*Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and ATCC PTA 5289) do not affect regrowth of mutans streptococci after full-mouth disinfection with chlorhexidine: a randomized controlled multicenter trial. *Caries Research*, 46(2), 140–146.  
<https://doi.org/10.1159/000337098>
- Keller, M. K., & Kragelund, C. (2018). Randomized pilot study on probiotic effects on recurrent candidiasis in oral lichen planus patients. *Oral Diseases*, 24(6), 1107–1114.  
<https://doi.org/10.1111/odi.12858>
- Keller, Mette K., Bardow, A., Jensdottir, T., Lykkeaa, J., & Twetman, S. (2012). Effect of chewing gums containing the probiotic bacterium *Lactobacillus reuteri* on oral malodour. *Acta Odontologica Scandinavica*, 70(3), 246–250.  
<https://doi.org/10.3109/00016357.2011.640281>
- Keller, Mette K., & Twetman, S. (2012). Acid production in dental plaque after exposure to probiotic bacteria. *BMC Oral Health*, 12(1), 44. <https://doi.org/10.1186/1472-6831-12-44>
- Kraft-Bodi, E., Jørgensen, M. R., Keller, M. K., Kragelund, C., & Twetman, S. (2015). Effect of Probiotic Bacteria on Oral Candida in Frail Elderly. *Journal of Dental Research*, 94(9 Suppl), 181S–6S. <https://doi.org/10.1177/0022034515595950>
- Kuru, B. E., Laleman, I., Yalnızoğlu, T., Kuru, L., & Teughels, W. (2017). The Influence of a *Bifidobacterium animalis* Probiotic on Gingival Health: A Randomized Controlled Clinical Trial. *Journal of Periodontology*, 88(11), 1115–1123.  
<https://doi.org/10.1902/jop.2017.170213>

- Laleman, I., Yilmaz, E., Ozcelik, O., Haytac, C., Pauwels, M., Herrero, E. R., ... Teughels, W. (2015). The effect of a streptococci containing probiotic in periodontal therapy: a randomized controlled trial. *Journal of Clinical Periodontology*, 42(11), 1032–1041. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12464>
- Lee, J.-K., Kim, S.-J., Ko, S.-H., Ouwehand, A. C., & Ma, D. S. (2015). Modulation of the host response by probiotic *Lactobacillus brevis* CD2 in experimental gingivitis. *Oral Diseases*, 21(6), 705–712. <https://doi.org/10.1111/odi.12332>
- Li, D., Li, Q., Liu, C., Lin, M., Li, X., Xiao, X., ... Zhou, H. (2014). Efficacy and safety of probiotics in the treatment of Candida-associated stomatitis. *Mycoses*, 57(3), 141–146. <https://doi.org/10.1111/myc.12116>
- Malik et al. (2017). (PDF) Evaluation of mouthwash containing *Lactobacillus* in localized periodontal pocket as an adjunct to non-surgical periodontal therapy in chronic periodontitis- a clinical & microbiological study. Retrieved March 9, 2019, from ResearchGate website: [https://www.researchgate.net/publication/315756879\\_EVALUATION\\_OF\\_MOUTHWASH\\_CONTAINING\\_LACTOBACILLUS\\_IN\\_LOCALIZED\\_PERIODONTAL\\_POCKET\\_AS\\_AN\\_ADJUNCT\\_TO\\_NON-SURGICAL\\_PERIODONTAL\\_THERAPY\\_IN\\_CHRONIC\\_PERIODONTITIS\\_-\\_A\\_CLINICAL\\_MICROBIOLOGICAL\\_STUDY](https://www.researchgate.net/publication/315756879_EVALUATION_OF_MOUTHWASH_CONTAINING_LACTOBACILLUS_IN_LOCALIZED_PERIODONTAL_POCKET_AS_AN_ADJUNCT_TO_NON-SURGICAL_PERIODONTAL_THERAPY_IN_CHRONIC_PERIODONTITIS_-_A_CLINICAL_MICROBIOLOGICAL_STUDY)
- Marttinen, A., Haukioja, A., Karjalainen, S., Nylund, L., Satokari, R., Öhman, C., ... Söderling, E. (2012). Short-term consumption of probiotic lactobacilli has no effect on acid production of supragingival plaque. *Clinical Oral Investigations*, 16(3), 797–803. <https://doi.org/10.1007/s00784-011-0584-1>
- Mendonça, F. H. B. P., Santos, S. S. F. dos, Faria, I. da S. de, Gonçalves e Silva, C. R., Jorge, A. O. C., & Leão, M. V. P. (2012). Effects of probiotic bacteria on Candida presence and IgA anti-Candida in the oral cavity of elderly. *Brazilian Dental Journal*, 23(5), 534–538.
- Miyazima, T. Y., Ishikawa, K. H., Mayer, M., Saad, S., & Nakamae, A. (2017). Cheese supplemented with probiotics reduced the Candida levels in denture wearers-RCT. *Oral Diseases*, 23(7), 919–925. <https://doi.org/10.1111/odi.12669>
- Mongardini, C., Piloni, A., Farina, R., Di Tanna, G., & Zeza, B. (2017). Adjunctive efficacy of probiotics in the treatment of experimental peri-implant mucositis with mechanical and photodynamic therapy: a randomized, cross-over clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, 44(4), 410–417. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12689>



- Montero, E., Iniesta, M., Rodrigo, M., Marín, M. J., Figuero, E., Herrera, D., & Sanz, M. (2017). Clinical and microbiological effects of the adjunctive use of probiotics in the treatment of gingivitis: A randomized controlled clinical trial. *Journal of Clinical Periodontology*, 44(7), 708–716. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12752>
- Morales, A., Gandolfo, A., Bravo, J., Carvajal, P., Silva, N., Godoy, C., ... Gamonal, J. (2018). Microbiological and clinical effects of probiotics and antibiotics on nonsurgical treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo- controlled trial with 9-month follow-up. *Journal of Applied Oral Science*, 26. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2017-0075>
- Mortazavi, S., & Akhlaghi, N. (2012). Salivary Streptococcus mutans and Lactobacilli levels following probiotic cheese consumption in adults: A double blind randomized clinical trial\*. *Journal of Research in Medical Sciences : The Official Journal of Isfahan University of Medical Sciences*, 17(1), 57–66. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC3523439/>
- Murugesan, G., Sudha, K. M., Subaramoniam, M. K., Dutta, T., & Dhanasekar, K. R. (2018). A comparative study of synbiotic as an add-on therapy to standard treatment in patients with aggressive periodontitis. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 22(5), 438–441. [https://doi.org/10.4103/jisp.jisp\\_155\\_18](https://doi.org/10.4103/jisp.jisp_155_18)
- Nadkerny, P. V., Ravishankar, P. L., Pramod, V., Agarwal, L. A., & Bhandari, S. (2015). A comparative evaluation of the efficacy of probiotic and chlorhexidine mouthrinses on clinical inflammatory parameters of gingivitis: A randomized controlled clinical study. *Journal of Indian Society of Periodontology*, 19(6), 633–639. <https://doi.org/10.4103/0972-124X.168491>
- Nagarajappa, R., Daryani, H., Sharda, A. J., Asawa, K., Batra, M., Sanadhya, S., & Ramesh, G. (2015). Effect of Chocobar Ice Cream Containing Bifidobacterium on Salivary Streptococcus mutans and Lactobacilli: A Randomised Controlled Trial. *Oral Health & Preventive Dentistry*, 13(3), 213–218. <https://doi.org/10.3290/j.ohpd.a32673>
- Nozari, A., Motamedifar, M., Seifi, N., Hatamizargaran, Z., & Ranjbar, M. A. (2015). The Effect of Iranian Customary Used Probiotic Yogurt on the Children's Salivary Cariogenic Microflora. *Journal of Dentistry*, 16(2), 81–86. Retrieved from <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4445856/>
- Oka, S. (2018). Potential synergistic effects of a mixture of mineral trioxide aggregate (MTA) cement and Bacillus subtilis in dental caries treatment. *Odontology*, 106(1), 46–55. <https://doi.org/10.1007/s10266-017-0305-6>

- Pahumunto, N., Piwat, S., Chankanka, O., Akkarachaneeyakorn, N., Rangsitsathian, K., & Teanpaisan, R. (2018). Reducing mutans streptococci and caries development by *Lactobacillus paracasei* SD1 in preschool children: a randomized placebo-controlled trial. *Acta Odontologica Scandinavica*, 76(5), 331–337. <https://doi.org/10.1080/00016357.2018.1453083>
- Peña, M., Barallat, L., Vilarrasa, J., Vicario, M., Violant, D., & Nart, J. (2018). Evaluation of the effect of probiotics in the treatment of peri-implant mucositis: a triple-blind randomized clinical trial. *Clinical Oral Investigations*. <https://doi.org/10.1007/s00784-018-2578-8>
- Penala, S., Kalakonda, B., Pathakota, K. R., Jayakumar, A., Koppolu, P., Lakshmi, B. V., ... Mishra, A. (2016). Efficacy of local use of probiotics as an adjunct to scaling and root planing in chronic periodontitis and halitosis: A randomized controlled trial. *Journal of Research in Pharmacy Practice*, 5(2), 86–93. <https://doi.org/10.4103/2279-042X.179568>
- Pinto, G. S., Cenci, M. S., Azevedo, M. S., Epifanio, M., & Jones, M. H. (2014). Effect of yogurt containing *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* DN-173010 probiotic on dental plaque and saliva in orthodontic patients. *Caries Research*, 48(1), 63–68. <https://doi.org/10.1159/000353467>
- Pol, A., Renkema, G. H., Tangerman, A., Winkel, E. G., Engelke, U. F., De Brouwer, A. P., ... & Olbrich, H. (2018). Mutations in SELENBP1, encoding a novel human methanethiol oxidase, cause extraoral halitosis. *Nature genetics*, 50(1), 120.
- Ritthagol, W., Saetang, C., & Teanpaisan, R. (2014). Effect of Probiotics Containing *Lactobacillus paracasei* SD1 on Salivary Mutans Streptococci and Lactobacilli in Orthodontic Cleft Patients: A Double-Blinded, Randomized, Placebo-Controlled Study. *The Cleft Palate-Craniofacial Journal: Official Publication of the American Cleft Palate-Craniofacial Association*, 51(3), 257–263. <https://doi.org/10.1597/12-243>
- Rodríguez, G., Ruiz, B., Faleiros, S., Vistoso, A., Marró, M. L., Sánchez, J., ... Cabello, R. (2016). Probiotic Compared with Standard Milk for High-caries Children: A Cluster Randomized Trial. *Journal of Dental Research*, 95(4), 402–407. <https://doi.org/10.1177/0022034515623935>
- Romani Vestman, N., Chen, T., Lif Holgersson, P., Öhman, C., & Johansson, I. (2015). Oral Microbiota Shift after 12-Week Supplementation with *Lactobacillus reuteri* DSM 17938 and PTA 5289; A Randomized Control Trial. *PloS One*, 10(5), e0125812. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0125812>

- Rungsri, P., Akkarachaneeyakorn, N., Wongsuwanlert, M., Piwat, S., Nantarakchaikul, P., & Teanpaisan, R. (2017). Effect of fermented milk containing *Lactobacillus rhamnosus* SD11 on oral microbiota of healthy volunteers: A randomized clinical trial. *Journal of Dairy Science*, 100(10), 7780–7787. <https://doi.org/10.3168/jds.2017-12961>
- Sabatini, S., Lauritano, D., Candotto, V., Silvestre, F. J., & Nardi, G. M. (2017). Oral probiotics in the management of gingivitis in diabetic patients: a double blinded randomized controlled study. *Journal of Biological Regulators and Homeostatic Agents*, 31(2 Suppl 1), 197–202.
- Saini, D., Gadicherla, P., Chandra, P., & Anandakrishna, L. (2017). Coconut milk and probiotic milk as storage media to maintain periodontal ligament cell viability: an in vitro study. *Dental Traumatology: Official Publication of International Association for Dental Traumatology*, 33(3), 160–164. <https://doi.org/10.1111/edt.12310>
- Sajedinejad, N., Paknejad, M., Houshmand, B., Sharafi, H., Jelodar, R., Shahbani Zahiri, H., & Noghabi, K. A. (2018). *Lactobacillus salivarius* NK02: a Potent Probiotic for Clinical Application in Mouthwash. *Probiotics and Antimicrobial Proteins*, 10(3), 485–495. <https://doi.org/10.1007/s12602-017-9296-4>
- Sarmiento, É. G., Cesar, D. E., Martins, M. L., de Oliveira Góis, E. G., Furtado Martins, E. M., da Rocha Campos, A. N., ... de Oliveira Martins, A. D. (2019). Effect of probiotic bacteria in composition of children's saliva. *Food Research International (Ottawa, Ont.)*, 116, 1282–1288. <https://doi.org/10.1016/j.foodres.2018.10.017>
- Schlagenhauf, U., Jakob, L., Eigenthaler, M., Segerer, S., Jockel-Schneider, Y., & Rehn, M. (2016). Regular consumption of *Lactobacillus reuteri*-containing lozenges reduces pregnancy gingivitis: an RCT. *Journal of Clinical Periodontology*, 43(11), 948–954. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12606>
- Shah, M. P., Gujjari, S. K., & Chandrasekhar, V. S. (2013). Evaluation of the effect of probiotic (inersan®) alone, combination of probiotic with doxycycline and doxycycline alone on aggressive periodontitis - a clinical and microbiological study. *Journal of Clinical and Diagnostic Research: JCDR*, 7(3), 595–600. <https://doi.org/10.7860/JCDR/2013/5225.2834>
- Sharma, A., Rath, G. K., Chaudhary, S. P., Thakar, A., Mohanti, B. K., & Bahadur, S. (2012). *Lactobacillus brevis* CD2 lozenges reduce radiation- and chemotherapy-induced mucositis in patients with head and neck cancer: a randomized double-blind placebo-controlled study. *European Journal of Cancer (Oxford, England: 1990)*, 48(6), 875–881. <https://doi.org/10.1016/j.ejca.2011.06.010>

- Song, Y.-G., & Lee, S.-H. (2017). Inhibitory effects of *Lactobacillus rhamnosus* and *Lactobacillus casei* on *Candida* biofilm of denture surface. *Archives of Oral Biology*, 76, 1–6. <https://doi.org/10.1016/j.archoralbio.2016.12.014>
- Stensson, M., Koch, G., Coric, S., Abrahamsson, T. R., Jenmalm, M. C., Birkhed, D., & Wendt, L.-K. (2014). Oral administration of *Lactobacillus reuteri* during the first year of life reduces caries prevalence in the primary dentition at 9 years of age. *Caries Research*, 48(2), 111–117. <https://doi.org/10.1159/000354412>
- Sudhir, R., Praveen, P., Anantharaj, A., & Venkataraghavan, K. (2012). Assessment of the effect of probiotic curd consumption on salivary pH and streptococcus mutans counts. *Nigerian Medical Journal : Journal of the Nigeria Medical Association*, 53(3), 135–139. <https://doi.org/10.4103/0300-1652.104382>
- Suzuki, N., Yoneda, M., Tanabe, K., Fujimoto, A., Iha, K., Seno, K., ... Hirofuji, T. (2014). *Lactobacillus salivarius* WB21--containing tablets for the treatment of oral malodor: a double-blind, randomized, placebo-controlled crossover trial. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, 117(4), 462–470. <https://doi.org/10.1016/j.oooo.2013.12.400>
- Szkaradkiewicz, A. K., Stopa, J., & Karpiński, T. M. (2014). Effect of Oral Administration Involving a Probiotic Strain of *Lactobacillus reuteri* on Pro-Inflammatory Cytokine Response in Patients with Chronic Periodontitis. *Archivum Immunologiae et Therapiae Experimentalis*, 62(6), 495–500. <https://doi.org/10.1007/s00005-014-0277-y>
- Taipale, T., Pienihäkkinen, K., Alanen, P., Jokela, J., & Söderling, E. (2013). Administration of *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 in early childhood: a post-trial effect on caries occurrence at four years of age. *Caries Research*, 47(5), 364–372. <https://doi.org/10.1159/000348424>
- Teanpaisan, R., & Piwat, S. (2014). *Lactobacillus paracasei* SD1, a novel probiotic, reduces mutans streptococci in human volunteers: a randomized placebo-controlled trial. *Clinical Oral Investigations*, 18(3), 857–862. <https://doi.org/10.1007/s00784-013-1057-5>
- Teanpaisan, R., Piwat, S., Tianviwat, S., Sophatha, B., & Kampoo, T. (2015). Effect of Long-Term Consumption of *Lactobacillus paracasei* SD1 on Reducing Mutans streptococci and Caries Risk: A Randomized Placebo-Controlled Trial. *Dentistry Journal*, 3(2), 43–54. <https://doi.org/10.3390/dj3020043>
- Tekce, M., Ince, G., Gursoy, H., Dirikan Ipci, S., Cakar, G., Kadir, T., & Yılmaz, S. (2015). Clinical and microbiological effects of probiotic lozenges in the treatment of chronic

- periodontitis: a 1-year follow-up study. *Journal of Clinical Periodontology*, 42(4), 363–372. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12387>
- Teughels, W., Durukan, A., Ozcelik, O., Pauwels, M., Quirynen, M., & Haytac, M. C. (2013). Clinical and microbiological effects of *Lactobacillus reuteri* probiotics in the treatment of chronic periodontitis: a randomized placebo-controlled study. *Journal of Clinical Periodontology*, 40(11), 1025–1035. <https://doi.org/10.1111/jcpe.12155>
- Thakkar. (2013). Effect of probiotic mouthrinse on dental plaque accumulation: A randomized controlled trial. Retrieved March 9, 2019, from <http://www.dmrjournal.org/article.asp?issn=2348-1471;year=2013;volume=1;issue=1;spage=7;epage=12;aulast=Thakkar>
- Toiviainen, A., Jalasvuori, H., Lahti, E., Gursoy, U., Salminen, S., Fontana, M., ... Söderling, E. (2015). Impact of orally administered lozenges with *Lactobacillus rhamnosus* GG and *Bifidobacterium animalis* subsp. *lactis* BB-12 on the number of salivary mutans streptococci, amount of plaque, gingival inflammation and the oral microbiome in healthy adults. *Clinical Oral Investigations*, 19(1), 77–83. <https://doi.org/10.1007/s00784-014-1221-6>
- Twetman, S., Keller, M. K., Lee, L., Yucel-Lindberg, T., & Pedersen, A. M. L. (2018). Effect of probiotic lozenges containing *Lactobacillus reuteri* on oral wound healing: a pilot study. *Beneficial Microbes*, 9(5), 691–696. <https://doi.org/10.3920/BM2018.0003>
- Twetman, Svante, Pedersen, A. M. L., & Yucel-Lindberg, T. (2018). Probiotic supplements containing *Lactobacillus reuteri* does not affect the levels of matrix metalloproteinases and interferons in oral wound healing. *BMC Research Notes*, 11(1), 759. <https://doi.org/10.1186/s13104-018-3873-9>
- Vicario, M., Santos, A., Violant, D., Nart, J., & Giner, L. (2013). Clinical changes in periodontal subjects with the probiotic *Lactobacillus reuteri* Prodentis: a preliminary randomized clinical trial. *Acta Odontologica Scandinavica*, 71(3–4), 813–819. <https://doi.org/10.3109/00016357.2012.734404>
- Villavicencio, J., Villegas, L. M., Arango, M. C., Arias, S., & Triana, F. (2018). Effects of a food enriched with probiotics on *Streptococcus mutans* and *Lactobacillus* spp. salivary counts in preschool children: a cluster randomized trial. *Journal of Applied Oral Science*, 26. <https://doi.org/10.1590/1678-7757-2017-0318>
- Wattanarat, O., Makeudom, A., Sastraruji, T., Piwat, S., Tianviwat, S., Teanpaisan, R., & Krisanaprakornkit, S. (2015). Enhancement of salivary human neutrophil peptide 1-3

levels by probiotic supplementation. *BMC Oral Health*, 15, 19.  
<https://doi.org/10.1186/s12903-015-0003-0>

Yousuf, A., Sidiq, M., Ganta, S., Nagaraj, A., Vishnani, P., & Jan, I. (2017). Effect of Freeze Dried Powdered Probiotics on Gingival Status and Plaque Inhibition: A Randomized, Double-blind, Parallel Study. *Contemporary Clinical Dentistry*, 8(1), 116–121.  
[https://doi.org/10.4103/ccd.ccd\\_836\\_16](https://doi.org/10.4103/ccd.ccd_836_16)

Zhang, M., Wang, F., Jiang, L., Liu, R., Zhang, L., Lei, X., ... Ren, F. (2013). Lactobacillus salivarius REN inhibits rat oral cancer induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. *Cancer Prevention Research (Philadelphia, Pa.)*, 6(7), 686–694. <https://doi.org/10.1158/1940-6207.CAPR-12-0427>

## Anexos

### Anexo 1 : Características dos diferentes probióticos utilizados nos ensaios clínicos

As estirpes ou combinação probiótica mais benéfica para a saúde oral ainda está por descobrir. Em função dos resultados obtidos nos ensaios clínicos mencionados anteriormente, *Lactobacillus spp.* parece um bom candidato, em particular *L. reuteri*.

Tabela a): Estirpes probióticas utilizadas nos ensaios clínicos com os seus potenciais mecanismos de ação

ECR's	Estirpe(s) probiótica(s)	Mecanismo(s) de ação
Hallström <i>et al.</i> , 2013- Sabatini <i>et al.</i> , 2017- Schlagenhauf <i>et al.</i> , 2016- Iniesta <i>et al.</i> , 2012- Teughels <i>et al.</i> , 2013- Peña <i>et al.</i> , 2018- Galofré <i>et al.</i> , 2018- Hallström <i>et al.</i> , 2016- Flichy-Fernández <i>et al.</i> , 2015- Alamoudi <i>et al.</i> , 2018- Cildir <i>et al.</i> , 2012- Romani Vestman <i>et al.</i> , 2015- Keller & Twetman 2012- Keller <i>et al.</i> , 2012- Braathen <i>et al.</i> , 2017- Jørgensen <i>et al.</i> , 2016- Keller <i>et al.</i> , 2012- Keller & Kragelund 2018- Kraft-Bodi <i>et al.</i> , 2015- Gizani <i>et al.</i> , 2016- Twetman <i>et al.</i> , 2018	<i>Lactobacillus reuteri</i> DSM17938	Produção de reuterina (proteína antimicrobiana), $\beta$ -defensina 2 salivar (péptido antimicrobiano sintetizado na parótida) Imunomodulação (citocina) Inibição competitiva, adesão
Hallström <i>et al.</i> , 2013- Sabatini <i>et al.</i> , 2017- Schlagenhauf <i>et al.</i> , 2016- Iniesta <i>et al.</i> , 2012- Szkaradkiewicz <i>et al.</i> , 2014- Vicario <i>et al.</i> , 2013- Teughels <i>et al.</i> , 2013- Peña <i>et al.</i> , 2018- Galofré <i>et al.</i> , 2018- Hallström <i>et al.</i> , 2016- Flichy-Fernández <i>et al.</i> , 2015- Alamoudi <i>et al.</i> , 2018- Cildir <i>et al.</i> , 2012- Romani Vestman <i>et al.</i> , 2015- Keller & Twetman 2012- Marttinen <i>et al.</i> , 2012- Keller <i>et al.</i> , 2012- Braathen <i>et al.</i> , 2017- Jørgensen <i>et al.</i> , 2016- Keller <i>et al.</i> , 2012- Keller & Kragelund 2018- Kraft-Bodi <i>et al.</i> , 2015- Gizani <i>et al.</i> , 2016- Twetman <i>et al.</i> , 2018	<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC PTA 5289	
Vicario <i>et al.</i> , 2013	<i>Lactobacillus reuteri</i> ATCC 55730	
Marttinen <i>et al.</i> , 2012	<i>Lactobacillus reuteri</i> SD2112	
Ikram <i>et al.</i> , 2019- Penala <i>et al.</i> , 2016- Ince <i>et al.</i> , 2015- Tekce <i>et al.</i> , 2015- Stensson <i>et al.</i> , 2014	<i>Lactobacillus reuteri</i>	
Laleman <i>et al.</i> , 2015- Hedayati-Hajikand <i>et al.</i> , 2015	<i>Streptococcus oralis</i> KJ3, <i>Streptococcus uberis</i> KJ2, <i>Streptococcus rattus</i> JH145	Produção de bacteriocina Síntese dextranase e urease
Burton <i>et al.</i> , 2013	<i>Streptococcus salivarius</i> M18	-
Li <i>et al.</i> , 2014	<i>Streptococcus thermophilus</i>	-
Yousuf <i>et al.</i> , 2017	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	-
Kuru <i>et al.</i> , 2017- Pinto <i>et al.</i> , 2014	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> DN-173010	-
Invernici <i>et al.</i> , 2018	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> HN019	-
Taipale <i>et al.</i> , 2013- Bafna <i>et al.</i> , 2018- Ashwin <i>et al.</i> , 2015- Bhalla <i>et al.</i> , 2015- Toivainen <i>et al.</i> , 2015- Jäsberg <i>et al.</i> , 2018	<i>Bifidobacterium animalis</i> subsp. <i>lactis</i> BB-12	-
Alanzi <i>et al.</i> , 2018- Yousuf <i>et al.</i> , 2017- Nozari <i>et al.</i> , 2015- Javid <i>et al.</i> , 2015	<i>Bifidobacterium lactis</i>	-
Deshmukh <i>et al.</i> , 2017- Yousuf <i>et al.</i> , 2017- Nadkerny <i>et al.</i> , 2015- Malik <i>et al.</i> , 2017- Villavicencio <i>et al.</i> , 2018- Thakkar, 2013- Li <i>et al.</i> , 2014	<i>Bifidobacterium longum</i>	-
Nagarajappa <i>et al.</i> , 2015	<i>Bifidobacterium infantis</i> 35624	-
Ishikawa <i>et al.</i> , 2014	<i>Bifidobacterium bifidum</i>	-
Sajedinejad <i>et al.</i> , 2018	<i>Lactobacillus salivarius</i> NK02	-
Suzuki <i>et al.</i> , 2014	<i>Lactobacillus salivarius</i> WB21	-
Penala <i>et al.</i> , 2016	<i>Lactobacillus salivarius</i>	Produção de bacteriocina, ácido láctico Imunomodulação (citocina) Modulação produção de mucina Reduz síntese de glicosiltransferase de <i>S. mutans</i>
Alanzi <i>et al.</i> , 2018- Deshmukh <i>et al.</i> , 2017- Nadkerny <i>et al.</i> , 2015- Malik <i>et al.</i> , 2017- Villavicencio <i>et al.</i> , 2018- Toivainen <i>et al.</i> , 2015- Thakkar, 2013	<i>Lactobacillus rhamnosus</i>	-



Keller <i>et al.</i> , 2018	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> PB01, DSM 14869	-
Morales <i>et al.</i> , 2018- Rodriguez <i>et al.</i> , 2016	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> SP1	-
Marttinen <i>et al.</i> , 2012- Jäsberg <i>et al.</i> , 2018	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> GG	-
Rungsri <i>et al.</i> , 2017	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> SD11	-
Ishikawa <i>et al.</i> , 2014	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> HS111	-
Miyazima <i>et al.</i> , 2017	<i>Lactobacillus rhamnosus</i> Lr-32	-
Keller <i>et al.</i> , 2018	<i>Lactobacillus curvatus</i> EB10, DSM 32307	-
Rungsri <i>et al.</i> , 2017- Li <i>et al.</i> , 2014	<i>Lactobacillus bulgaricus</i>	-
Deshmukh <i>et al.</i> , 2017- Yousuf <i>et al.</i> , 2017- Nadkerny <i>et al.</i> , 2015- Malik <i>et al.</i> , 2017- Sudhir <i>et al.</i> , 2012- Thakkar, 2013	<i>Lactobacillus acidophilus</i>	Produção de peróxido de hidrogénio
Bafna <i>et al.</i> , 2018- Ashwin <i>et al.</i> , 2015	<i>Lactobacillus acidophilus</i> LA5	Produção de peróxido de hidrogénio
Ishikawa <i>et al.</i> , 2014	<i>Lactobacillus acidophilus</i> HS101	Produção de peróxido de hidrogénio
Miyazima <i>et al.</i> , 2017	<i>Lactobacillus acidophilus</i> NCFM	Produção de peróxido de hidrogénio
Montero <i>et al.</i> , 2017- Mongardini <i>et al.</i> , 2017	<i>Lactobacillus plantarum</i>	-
Iwasaki <i>et al.</i> , 2016	<i>Lactobacillus plantarum</i> L-137	-
Montero <i>et al.</i> , 2017- Mongardini <i>et al.</i> , 2017	<i>Lactobacillus brevis</i>	-
Lee <i>et al.</i> , 2015- Shah <i>et al.</i> , 2013- Campus <i>et al.</i> , 2014- Sharma <i>et al.</i> , 2012	<i>Lactobacillus brevis</i> CD2	Reduz o substrato arginina, inibe a produção de NO (ação anti-inflamatória)
Imran <i>et al.</i> , 2015- Sarmiento <i>et al.</i> , 2019	<i>Lactobacillus casei</i>	-
Mortazavi & Akhlaghi 2012	<i>Lactobacillus casei</i> LAFTI L26	-
Pahumunto <i>et al.</i> , 2018- Teanpaisan <i>et al.</i> , 2015- Teanpaisan & Piwat 2014- Wattanarat <i>et al.</i> , 2015- Ritthagol <i>et al.</i> , 2014	<i>Lactobacillus paracasei</i> SD1	Produção de paracasina (proteína antimicrobiana) Adesão aos tecidos orais
Hasslöf <i>et al.</i> , 2013	<i>Lactobacillus paracasei</i> F19	Produção de paracasina
Nadkerny <i>et al.</i> , 2015- Dhawan & Dhawan 2013- Murugesan <i>et al.</i> , 2018- Malik <i>et al.</i> , 2017	<i>Lactobacillus sporogenes</i>	-
Deshmukh <i>et al.</i> , 2017- Malik <i>et al.</i> , 2017- Chandra <i>et al.</i> , 2016- Thakkar, 2013	<i>Saccharomyces boulardii</i>	-
Nadkerny <i>et al.</i> , 2015	<i>Saccharomyces</i>	-
Yousuf <i>et al.</i> , 2017	<i>Bacillus</i> do ácido láctico	-
Alkaya <i>et al.</i> , 2017	<i>Bacillus subtilis</i> , <i>Bacillus megaterium</i> , <i>Bacillus pumilus</i>	-
Dhawan & Dhawan 2013- Murugesan <i>et al.</i> , 2018	<i>Bacillus mesentericus</i> TO-A	-
Montero <i>et al.</i> , 2017	<i>Peiococcus acidilactici</i>	-
Dhawan & Dhawan 2013	<i>Streptococcus faecalis</i> PC	-
Dhawan & Dhawan 2013- Murugesan <i>et al.</i> , 2018	<i>Clostridium butyrium</i> TO-A	-
Limaye <i>et al.</i> , 2013	<i>Lactococcus lactis</i> (AG013)	-

Várias estirpes de lactobacilos sintetizam proteína antimicrobiana contra vários patogénicos para inibir seletivamente o crescimento microbiano (ex. o peróxido de hidrogénio é gerado por ácidos gordos saturados presentes nas membranas bacterianas dos *Lactobacillus spp.*) (Tabela a)). O *L. paracasei* e o *L. reuteri* produzem respetivamente paracasina e reuterina/reuteriicina (Teanpaisan *et al.*, 2015). A reuterina (3-hidroxi- $\gamma$ -butirato, similar ao peróxido de hidrogénio) tem um amplo espectro de ação, pode atuar em várias condições de pH, é resistente às enzimas proteolíticas, bloqueia a síntese de citocinas inflamatória e a adesão/colonização dos patogénicos (Szkardkiewicz *et al.*, 2014).



*L. reuteri* (bactericida e bacteriostático, induz estresse oxidativo intracelular) tem propriedades anti-inflamatórias/imunossupressoras (exs. reduz TNF- $\alpha$ , IL-8, IL-1 $\beta$ , MMPs, PGE2, interferon  $\gamma$ , LPS). Várias estirpes são utilizadas, como o *L. reuteri* PTA 5289 por exemplo comensal salivar (İnce *et al.*, 2015a; Romani Vestman *et al.*, 2015; Teughels *et al.*, 2013). O *L. reuteri* participa na inibição da translocação do Nf-kB para o núcleo e na inibição da via das MAP-kinase através da L-histidina permitindo reduzir a resposta inflamatória. Ademais, pode impedir a ativação de fator de transcrição ativador de proteína 1 que regula a expressão das citocinas pró-inflamatórias em resposta à ativação do recetor *toll-like* (Sharma *et al.*, 2012, 2017b; S. Twetman *et al.*, 2018) (Chandra *et al.*, 2016).

*L. brevis* CD2 (comensal oral e intestinal) produz grande quantidade de arginina desaminase, arginase e esfingomielinase (esta ultima hidrolisa o fator ativador de plaqueta e as citocinas inflamatórias associadas a mucosite provocada por radioterapia) (Campus *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2012, 2017b). A enzima arginina desaminase (converte a arginina em amónia e citrulina) compete pelo substrato arginina necessário ao funcionamento da enzima NO-sintase responsável pela produção de NO e de poliaminas (putrescina, espermidina, espermina) (Campus *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2012, 2017b). O NO está envolvido na inflamação (favorece a produção de citocinas IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-8, TNF- $\alpha$ , IFN- $\gamma$ , PGE2 e MMPs), na halitose (favorece a síntese de prostaglandinas e enzimas proteolíticas que fornecem péptidos e aminoácidos às bactérias odoríferas para sintetizar os VCS) (Campus *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2012, 2017b). A redução do NO promove a neutralização do efeito inibitório do LPS (em bactérias gram-negativas) e permite indiretamente a produção de mucina salivar protetora. Por fim, a arginina desaminase aumenta o pH (graças a amónia), fazendo com que *F. nucleatum* metaboliza a glicose e não os aminoácidos, permitindo uma redução na síntese de VCS (Campus *et al.*, 2014; Lee *et al.*, 2015; Sharma *et al.*, 2012, 2017b).

*S. mutans* e *Candida spp.* são sinérgicos e representam uma flora comorbida. A patogenicidade de *S. mutans* passa pela síntese de exopolissacarídeos insolúveis/glucanos a partir da sacarose pelas glicosiltransferase (sob controlo de *quorum sensing*) e pela síntese de ácido. Os probióticos *L. salivarius* e *Lactobacillus lactis* podem inibir o gene que codifica para as glicosiltransferases, reduzindo a virulência do *S. mutans*, podem

interferir com os genes de tolerância ao ácido (exs. AguD e ApD). Estes probióticos podem ainda inibir a filamentação de *C. albicans*, etapa essencial para a formação do biofilme por esta levedura, e podem também destabilizar a arquitetura do biofilme formado por *C. albicans* (Li *et al.*, 2014) (Ishikawa *et al.*, 2015).

*Bifidobacterium* tem a capacidade de co-agregar com o *F. nucleatum* e de ligar-se a hidroxiapatite coberta por ele. Ele pode reduzir os sítios de ligação para os periodontopatogênicos como *T. forsythia* (Invernici *et al.*, 2018). *F. nucleatum* pode co-agregar com vários microrganismos (“*bioponte*”), incluindo os probióticos (90% de co-agregação com os *Lactobacillus spp.*), permitindo aos probióticos descolar os patogênicos do biofilme.

#### Anexo 2: Outros parâmetros intervindo nos efeitos dos probióticos

Os ensaios clínicos utilizaram diversos veículos de entrega, diferentes doses, frequências e durações de consumo para administrar localmente os probióticos orais sem relatar a persistência na cavidade oral. No entanto, a ingestão repetida independentemente do veículo permite manter o efeito, tal como um tempo de contato prolongado (mais viscoso). Estes veículos foram: intra-bolsa (aplicação subgengival direta), bochecho, pasta dentífrica, limpador de escova, comprimido, cápsula ou losango, gota, óleo de aplicação tópica, chupeta de libertação lenta, produtos lácteos (leite, iogurte, queijo, requeijão, bebida láctea, sorvetes) ou suplementos dietéticos (colhada, pastilhas, gomas de mascar, preparação liofilizada).

Em função da faixa-etária estudada, o veículo apropriado será diferente. Os produtos lácteos (contendo também caseína, cálcio, fósforo ao qual acrescentam-se bactérias benéficas) são os mais adequados para as crianças (o sorvete por exemplo pode ser armazenado muito tempo sem perder as células viáveis) (Nagarajappa *et al.*, 2015). Em termos de adesão/conformidade, o consumo de pastilhas, duas vezes ao dia, após escovagem também parece adequado em crianças (ex. nos estudos de Burton *et al.* (2013), Camps *et al.* (2014), Romani Vestman *et al.* (2015)). Em idosos, a diminuição do fluxo salivar e xerostomia favorecem a retenção dos probióticos/tempo de contato (Miyazima *et al.*, 2017).

Os suplementos dietéticos permanecem durante a mastigação, mas não há contato direto à propriamente dito (ex: aplicação direta sobre as próteses de queijo forneceu resultados mais promissores do que a sua ingestão durante as refeições) (Miyazima *et al.*, 2017) (Ishikawa *et al.*, 2015). Os resultados do uso de probióticos também dependem da idade e do momento da intervenção (é mais fácil para os probióticos atuar num biofilme jovem) (Gizani *et al.*, 2016). A eliminação prévia do biofilme maduro parece facilitar a ação dos probióticos (probióticos administrados como adjuvantes ao alisamento radicular), mas não basta eliminá-lo para observar os efeitos dos probióticos na saúde oral porque outros fatores podem ser importantes como a forma de aplicação do probiótico (Alkaya *et al.*, 2017; İnce *et al.*, 2015a; Vicario *et al.*, 2013) Por exemplo a aplicação subgingival é mais eficiente do que o bochecho.

Em resumo, deve encontrar-se o veículo que permite o maior/melhor tempo de contacto com as superfícies orais, o intervalo de administração o mais em adequação com o dia-a-dia para aumentar as hipóteses de colonização. Os resultados obtidos com um veículo não podem ser generalizados/extrapolados para outros modos de aplicação, e isto é válido para todos os outros fatores como a frequência de administração, a dosagem diária (M. K. Keller & Kragelund, 2018; Vicario *et al.*, 2013). A disponibilização de pré-biótico (como o fruto-oligossacárido usado no ensaio de Chandra *et al.* (2016) ou *S. faecalis* no ensaio de Murugesan *et al.* (2018)) poderia eventualmente melhorar a sobrevivência dos probióticos (Jose *et al.*, 2013b).

### Anexo 3: Limitações dos estudos

Embora tenham sido selecionados ensaios clínicos randomizados, com ocultação simples, dupla ou tripla, controlado ou não por placebo, os resultados conflitantes dificultaram a elaboração de conclusões categóricas sobre a eficácia dos probióticos na saúde oral. Com efeito, os estudos incluídos tiveram tamanho de amostra pequeno, muitas vezes não suficiente para destacar diferenças significativas entre os grupos probiótico e placebo (risco de erro tipo II com presença de falsos negativos). As intervenções foram de curto prazo sendo necessários tempo de intervenção mais longos para alcançar efeito, para avaliar efeitos residuais/adicionais ou manutenção dos efeitos (ex. a incidência da cárie observa-se num longo período de seguimento). Os fatores de confusão/influenciadores (dieta, flúor, condição socioeconómica) devem ser claramente

definidos e comparáveis entre os grupos para conseguir destacar a real influência dos probióticos (Alamoudi *et al.*, 2018; Ikram *et al.*, 2019; Invernici *et al.*, 2018).

A aplicação dos probióticos no âmbito da ortodontia, deve ser avaliada desde o início da colocação dos aparelhos para evitar vieses. No estudo de Gizani *et al.* (2016), o fato de ter iniciado o estudo após 6 meses de colocação dos brackets tornou incorreta a contagem inicial real de *white spot* e prejudicou os resultados do efeito dos probióticos avaliados. Quando se analisa a contagem salivar dos cariogênicos em pacientes ortodônticos em vez de analisar a contagem na placa ao redor dos brackets, isto leva a uma estimativa da contagem total e não a uma contagem específica da superfície do dente onde estão alojadas essas bactérias patogênicas (Jose *et al.*, 2013a). Além disso, nenhum estudo avaliou o potencial corrosivo destes agentes (que aumenta o risco de maior adesão dos patogênicos por aumento da rugosidade), embora se saiba que no ambiente oral os produtos ácidos oriundos do metabolismo bacteriano promovem a corrosão. Deve avaliar-se o papel dos probióticos nos osteoclastos porque os probióticos podem prejudicar o tratamento ortodôntico, interferindo com o movimento e a remodelação óssea pela alteração da osteoclastogênese. Pelo contrário este efeito é procurado em periodontologia para uma correta remodelação após uma reabsorção óssea.

Os estudos sobre a influência dos probióticos na cárie dentária que avaliam a contagem dos agentes cariogênicos na saliva incorrem numa limitação na interpretação dos resultados na medida em que a contagem salivar não está diretamente associada a virulência da placa e ao risco de ocorrência de cárie. Além disso, outros fatores estão envolvidos no processo de lesão cariosa (Stensson *et al.*, 2014).

Os períodos de *washout* (tempo dado para que efeitos ativos do primeiro tratamento se eliminem antes o início do segundo tratamento) nos ensaios cruzados (os participantes recebem cada intervenção sequencialmente numa ordem aleatória) são variáveis, mas devem ser suficientes para evitar a transferência de probiótico e, não superestimar os valores iniciais, sabendo que a eliminação dos *Lactobacillus spp.* ocorre por volta de um mês após cessação e que as citocinas demoram duas semanas para voltar aos valores iniciais. No entanto vários fatores (individuais, ecológicos) podem alterar estas estimativas que não são absolutas (Mongardini *et al.*, 2017; Romani Vestman *et al.*, 2015). Qualquer fonte de probióticos tem que ser adequadamente excluída das dietas dos

participantes. O estado de higiene oral dos participantes deve ser padronizado antes o início do estudo ou então a profilaxia oral deve ser realizada pouco antes da intervenção para eliminar qualquer fonte de viés (Vicario *et al.*, 2013).

O desafio das análises microbiológicas reside no facto de que as amostras devem ser representativas da condição estudada (Jose *et al.*, 2013b). De facto, os resultados encontrados entres os diferentes nichos orais (ex: placa e saliva) não podem/devem ser comparados diretamente devido ao facto de que eles têm ecologias distintas. Além disso, será mais correto avaliar o estado inflamatório periodontal no GCF do que na saliva (Ince *et al.*, 2015a).

Ademais, quando as populações de estudo são adultos, não se sabe a exata exposição passada dos indivíduos aos probióticos (pensa-se que uma exposição aos probióticos no leite materno e na infância permitirá uma colonização natural e permanente mais tarde na vida). Embora, os questionários breves sejam elaborados para conhecer o consumo diário de probiótico, não se pode saber de maneira absoluta a exposição dos participantes durante a infância (Braathen *et al.*, 2017).

A elaboração de ensaios clínicos em população com saúde oral pode não ser apropriada para avaliar os efeitos dos probióticos, as probabilidades de resultar são muito menores do que num ecossistema em desequilíbrio que precisa de tratamento para restabelecer o equilíbrio ecológico (Mette K. Keller & Twetman, 2012). Igualmente, a indução experimental de gengivite não certifica que os indivíduos vão reagir da mesma maneira que indivíduos com “verdadeira” gengivite. Isto impossibilita a elaboração de protocolo terapêutico adequado à base de agentes probióticos (Kuru *et al.*, 2017), porque a população experimental não é representativa da população com microbioma disbiótico (M. K. Keller *et al.*, 2018).

Todos os métodos de deteção microbiana têm limitações. É difícil cultivar quantidades mínimas microbianas, é preciso tempo, custo, e profissional experimentado. Com as técnicas de PCR, apesar de ser específica, sensível, e, detetar as bactérias viáveis e não viáveis, há limitações: os *primers* conseguem diferenciar o *L. reuteri* de outras espécies de lactobacilos, mas não diferenciam as estirpes de *L. reuteri* entre elas. Além disso, o risco zero de ter reação cruzada não existe (os *primers* não são 100% específicos). Estes factos, superestimam os níveis verdadeiramente presentes/detetáveis de probiótico

(Braathen *et al.*, 2017) (Jose *et al.*, 2013b). Para identificar as espécies, o gene 16S rRNA apresenta restrições, como por exemplo: limitações na resolução taxonômica por causa da curta dimensão do fragmento sequenciado e analisado, distorção do perfil da microbiota (por contaminação na extração/purificação do ADN) (Romani Vestman *et al.*, 2015).

Como mencionado anteriormente, o efeito *Hawthorne* (viés de atenção do participante) pode tornar incorretas as observações da eficácia dos probióticos sobre a microflora oral/acumulação de placa e sobrestimar os efeitos reais atribuídos ao uso dos probióticos. De facto, sabendo que o participante está monitorizado/observado, ele tem mais cuidados com a sua saúde oral do que habitualmente (mudança positiva do participantes nos cuidados orais) (Montero *et al.*, 2017; Pinto *et al.*, 2014; Yousuf *et al.*, 2017b) (Hedayati-Hajikand *et al.*, 2015b) (Alamoudi *et al.*, 2018) (Lee *et al.*, 2015). Os grupos devem ser comparáveis entre eles do início até o fim da investigação em qualquer uma das variáveis para evitar o viés de comparação. Devem ser considerados os vieses de relato/notificação (quando os resultados são seletivos ou incompletos e quando os autores discordam dos principais resultados). A elaborar estudos com base em estudos anteriores, os investigadores devem tomar em conta os vieses de publicação: as publicações de estudos com evidências positivas têm tendência a ser mais publicadas, há um risco de amostra de estudo não representativo (Jørgensen *et al.*, 2016). No que diz respeito ao viés de atrito, devem ser consideradas as taxas de perda de acompanhamento indicando as razões, se alguns participantes forem excluídos/perdidos após a randomização, se os participantes forem analisados nos grupos aos quais foram originalmente randomizados, se os dados foram imputados para os participantes perdidos na monitorização, e, se a falta de dados associadas a tudo isto tiveram impacto relevante na dimensão do efeito. O recrutamento pode levar a viés de seleção, uma vez que as barreiras linguísticas e culturais dificultam este processo e o seguimento a longo prazo pode resultar em viés de atrito (Hedayati-Hajikand *et al.*, 2015b).

A fabricação comercial/farmacêutica dos probióticos, transporte, armazenamento, desidratação e as variações de temperatura podem trazer falhas como a perda da culturabilidade/viabilidade o que pode tornar os probióticos inativos. As marcas probióticas têm diferentes quantidades de células viáveis, sendo interessante saber se a maioria atinge ou não a dosagem recomendada porque os probióticos trazem benefícios

quando estão vivos unicamente; igualmente é primordial utilizar combinações probióticas com estirpes que não sejam antagonistas umas das outras (Chandra *et al.*, 2016).

Uma vez que os estudos/intervenções foram heterogêneos (no desenho de estudo, estirpes probióticas usadas, veículos usados, tempo de administração e características dos participantes), as comparações entre os ensaios são muito limitadas, o que dificulta a realização de meta-análise. No entanto, apesar desta disparidade e da presença de numerosas limitações, existe uma série de efeitos positivos dos agentes probióticos nas áreas da periodontologia, cariologia, ortodontia, halitose, candidíase, ferida oral e mucosite oral (Galofré *et al.*, 2018; Mette K. Keller & Twetman, 2012; Sajedinejad *et al.*, 2018).

#### Anexo 4: Importância dos estudos *in vitro* e em animais antes a elaboração de ECR's

Os resultados *in vitro* nem sempre são aplicáveis *in vivo* devido a complexidade da microbiota oral, onde existem uma variedade de interações sinérgicas e antagonistas. Com efeito, é difícil simular o ecossistema da cavidade oral *in vitro* e realizar modelos de biofilme (comporta uma matriz complexa estruturada com microrganismos e substância polimérica extracelular). Existem mais de 700 espécies microbianas na cavidade oral, e o verdadeiro mecanismo de formação do biofilme patogénico não está totalmente elucidado. No entanto os estudos quer *in vitro* quer em modelo animal são importantes para investigar os novos candidatos probióticos, aprofundar os conhecimentos, encontrar novos dados sobre as doenças orais e novas oportunidades para manter o equilíbrio ecológico oral. Com efeito, não se deve erradicar todos os agentes patogénicos porque a barreira entre o comensalismo e o parasitismo é estreita. Há o risco de que os patobiontes comensais, se tornem patogénicos em caso de interrupção do equilíbrio. Os estudos *in vitro* e em animais permitem obter uma base científica maior para assegurar o sucesso dos estudos clínicos realizados posteriormente (Zhang *et al.*, 2013) (Bohora & Kokate, 2017) (Oka, 2018). Alguns destes estudos relacionados com a medicina dentária oral chamaram a nossa atenção.

No estudo *in vitro* de Oka (2018) o *Bacillus subtilis* (agente probiótico esporádico) foi adicionado ao cimento MTA (pH alcalino) para testar esta combinação na cárie dentária. Os objetivos eram avaliar a viabilidade da estirpe probiótica e a sua sinergia

com o cimento para inibir o biofilme de *S. mutans*. A proliferação de bactérias vegetativas de *B. subtilis* a partir da mistura de cimento MTA e pó de esporos de *B. subtilis* foi observada. O ambiente anaeróbico e pH alto não impediram esta proliferação, permitindo dizer que o *B. subtilis* pode sobreviver em condição hipóxica e desempenhar o seu papel antimicrobiano. Contudo, não inibiu o *S. mutans*, mas sim *S. aureus* e *L. casei*. O MTA teve efeito antimicrobiano sobre *S. mutans* e *S. aureus*. Foi concluído que a combinação pode ser útil no tratamento de lesões cariosas.

O estudo *in vitro* de Bohora & Kokate (2017) relacionado com a endodontia utilizou os probióticos como adjuvante para prevenir o crescimento bacteriano de *S. faecalis* e *C. albicans* conhecidos por ser responsáveis por recorrência nas infecções após tratamento dos canais radiculares. Foram utilizados *Lactobacillus spp.* e *Bifidobacterium spp.* como medicamento intra-canal (através de o veículo de entrega poloxamero 407) para testar a resistência dos agentes patogénicos. A ideia atrás foi superar e eliminar os patogénicos, lidar contra as infecções recorrentes e a falha dos tratamentos endodôntico por persistência de microrganismos resistentes dentro dos canais radiculares. Os grupos probióticos mostraram redução da contagem de colônias e no biofilme de *E. faecalis* e não de *C. albicans*.

Zhang *et al.* (2013) em ratos com cancro oral induzido por 1-óxido-4-nitroquiolina (4NQO) verificou que *L. salivarius* REN tinha antigenotoxicidade dose-dependente: permitiu a proteção do ADN contra a oxidação, a indução da apoptose, a redução do antígeno nuclear responsável da proliferação celular.

Os estudos de Caglar *et al.* (2015) e Saini, Gadicherla, Chandra, & Anandakrishna (2017) utilizaram os probióticos *B. animalis* DN 173010 e *L. acidophilus* LA5 e *B. animalis lactis* BB-12 como meio de transporte/armazenamento de dentes avulsionados. O conceito foi o seguinte: os probióticos podem influenciar positivamente o prognóstico a longo prazo de dentes reimplantados pela capacidade de manter a viabilidade das células do ligamento periodontal, e admitir um período extra-alveolar maior. Com a utilização destes agentes a conservação do número de células viáveis foi maior do que os produtos atualmente utilizados (soro fisiológico, leite, saliva). Os probióticos mostraram ação citoprotetora e inibição da apoptose induzida por citocinas.



